



# Mise en évidence des acteurs moléculaires de la symbiose chimiosynthétique chez *Bathymodiolus azoricus* : une approche OMIC

Camille Detree

## ► To cite this version:

Camille Detree. Mise en évidence des acteurs moléculaires de la symbiose chimiosynthétique chez *Bathymodiolus azoricus* : une approche OMIC. Biologie animale. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066575 . tel-01332560

**HAL Id: tel-01332560**

**<https://theses.hal.science/tel-01332560>**

Submitted on 16 Jun 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme

*Laboratoire Adaptation et Biologie des Invertébrés en Conditions Extrêmes (ABICE)*

## **Mise en évidence des acteurs moléculaires de la symbiose chimiosynthétique chez *Bathymodiolus azoricus*:**

### **Une approche OMIC**

Par DETREE Camille

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par François Lallier et Jean Mary

Présentée et soutenue publiquement le 10 décembre 2015

Devant un jury composé de :

M. ALLAM Bassem, Professeur School of Marine and Atmospheric Sciences, Rapporteur

M. ALLEMAND Denis, Professeur Centre Scientifique de Monaco, Rapporteur

M. DUPERRON Sébastien, Maître de Conférences UPMC, Examineur

M. MARY Jean, Maître de Conférences UPMC, Directeur de Thèse

M. SELOSSE Marc-André, Professeur Muséum National d'Histoire Naturelle, Examineur

M. VERDIER Yann, Maître de Conférences ESPCI, Examineur

*La mer*  
*Qu'on voit danser le long des golfes clairs*  
*À des reflets d'argent*  
*La mer*  
*Des reflets changeants*  
*Sous la pluie*

*La mer au ciel d'été*  
*Confond ses blancs moutons*  
*Avec les anges si purs*  
*La mer bergère d'azur*  
*Infinie*



## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury, Bassem et Denis d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et d'avoir fait tout ce chemin jusqu'à Roscoff, Marc-André d'avoir accepté de participer à ce jury ainsi que Sébastien et Yann qui m'ont pourtant bien assez vue durant ces trois années! Sébastien, et Jean Michel, je tiens à vous remercier de m'avoir procuré conseils et solutions lors de mon comité de thèse qui m'ont permis d'aller de l'avant.

Avec cette thèse je souhaiterais rendre hommage à Dominique, membre de l'équipe ABICE, qui nous a quitté cette année. Dominique, je suis fière d'avoir réussi à gagner au fil du temps ta confiance et ton respect, tu nous manques à tous.

Je remercie également l'équipe ABICE de m'avoir accueillie, acceptée et conseillée durant ces trois ans et demi. Merci à Stéphane et Didier pour leurs conseils et oreilles attentives (notamment pour l'utilisation de R) et à Arnaud sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Je tiens également à remercier mon chef Jean. On aura réussi, malgré les tempêtes à survivre trois ans et demi dans le même bureau et franchement je ne sais pas qui de toi ou de moi a le plus de mérite ;-). Blague à part, merci d'avoir été là, d'avoir supporté ma susceptibilité à certaines périodes et d'avoir accepté que je sois têtue comme une mule. Mais surtout merci d'avoir supporté mes regards noirs sans sourciller, d'être resté contre vents et marées bienveillant à mon égard et d'avoir cru en moi depuis le master. Voilà un chef de remercié ! Au tour du Grand chef, François, merci de ta confiance que ce soit en congrès, en campagne, ou sur mon travail de thèse, tu m'as toujours donné l'impression de faire les choses correctement et pour un étudiant en thèse, ça n'a pas de prix. Merci de m'avoir permis de partir en campagne et pour les super conditions de congrès (au Mans ou à Lisbonne !), on ne s'ennuie pas avec le Grand chef !

Je tiens aussi à exprimer toute ma gratitude au laboratoire de spectrométrie de masse et protéomique à l'ESPCI pour les analyses de spectro de masse mais aussi pour la bonne humeur qui y règne. A chaque passage dans vos murs vous avez failli me convertir aux horoscopes (!) et me faire oublier que la mer me manquait. Iman, Manue, Joelle, vous m'avez plus d'une fois sauvé la vie, merci de vous être arrachées les cheveux sur mes moules!

Je me dois aussi de remercier la Station Biologique de Roscoff, c'est assez vague je le conçois, mais cette Station est habitée de tout un tas de gens géniaux (Non, non, pas tous,

n'exagérons rien !). A commencer par Brigitte qui a dû sauver la vie de plus d'un étudiant ou chercheur qui devait envoyer un colis pour hier, mais aussi tout le personnel du Gulf Stream (Franck, Barbara, Pascale, Isabelle, Maryline...) pour leur enthousiasme et leur joie de vivre ! Bien sur, je me dois de remercier Manch', qui malgré son humeur parfois (doux euphémisme ?) grumpy, nous a tous sauvés de la paperasse administrative de cette dernière année pour que nous puissions nous consacrer pleinement à la rédaction de nos thèses. Bon bien sûr merci aussi pour ton humour, et pour les sessions potins au café. Dans la foulée, un grand merci à Steph, pour avoir un potentiel à la fois drôle et relou non négligeable (What did you expect ?), mais surtout pour ta présence en cas de besoin, même quand je débarquais en trombe dans ton bureau alors que le temps te faisait défaut. De nombreuses personnes auront marqué ces trois années roscovites, mais c'est grâce à mes amis qu'elles ont été si épanouissantes. Je souhaite donc remercier de tout mon cœur les Village people, les copains, mes partenaires de craquages, mes collègues Heloïse, Kevin, Remy et Pierrot. Pierrot, pour te paraphraser t'es vraiment un gars CHOUETTE, une jolie découverte en tout cas, tu m'as émerveillée grâce à tes expressions et péripéties qui me donnent le sourire à chaque fois que j'y pense #Tocard ! Kevin et Remy, mes deux petits cocos du cul, je comprends maintenant toute la difficulté que vous avez pu avoir lors de l'écriture de vos remerciements... Je ne sais pas si je dois vous remercier d'avoir été de si bons amis, de m'avoir fait rire, de m'avoir fait découvrir tout un tas de films plus drôles les uns que les autres, de m'avoir fait si souvent (trop souvent ?) à manger, ou juste d'avoir répondu à mes questions bêtes (mais pourquoi le soleil est rouge quand il se couche ?) et d'avoir fini par accepter mon manque de tonicité dans les mains !! « Je clair ne pas ? » Enfin merci à Liloose pour avoir été une si bonne amie, oreille, conseillère, jumelle (mouhaha !!) merci pour l'immersion bretonne, je ne serais plus jamais garée très loin, mais pour toujours à penndach, promis je prendrai mes louzous, et je ne boirai plus jamais de Rhum sans chanter « du rhum des femmes et de la bière... » ! Il avait raison Bill Withers, "Just the two of us we can make it if we tryyy"! We did it pepette!

Je tiens aussi à remercier tous les autres copains Roscovites, Emeline, Steve, Gaga, Mati, Clem, Elodie, Jabibi, Apolline et bien sûr le coloc, la Cagoul et Ricemau du cul !

Même si nous sommes dispersées, je remercie de tout mon cœur La team des 4 fantastiques, merci les girls d'avoir été là pour m'assurer que malgré les obstacles j'y arriverai, pour tous ces moments de rires et de pleurs et ces vacances magiques (la Réunion, le Canada, la Rochelle.. ;)). Et même si on a vu qu'Ariel, en vrai, elle est vachement moins jolie que ce qu'on croyait, ben merci d'avoir trouvé la meilleure chanson pour accompagner cette

thèse...**Sous l'océan, sous l'océan, Doudou c'est bien mieux, Tout le monde est heureux, Sous l'océan.** KKL TTY, ZZP, ACP, la vie est une comédie musicale!

Papa, Maman, Sarah, Jerem, Nandrou j'espère que vous serez fiers de votre fille et petite sœur. Papa, je ne serai pas Président de la République, enfin ça a l'air mal barré, mais mon éternel envie de savoir, et d'apprendre semble avoir trouvé un métier à la hauteur du défi ! Je tiens à vous remercier pour votre amour, soutien, et accompagnement dans mes différents choix. Jerem, Nandrou, quand j'aurai initié Anna au poney, je compte bien lui parler un peu biologie...ahah, Bienvenue à elle dans la famille ! Et bien sûr, une petite pensée pour Patty et Cyrano qui nous manquent.

Enfin, je voudrais remercier mon amoureux d'avoir été là, plus patient que quiconque, plus mignon que quiconque face à ce tsunami d'esbourbissement que j'ai pu être. Merci de m'avoir fait rire après des journées de prise de tête, merci pour tes conseils, ton aide, ton écoute et ton soutien sans faille. Si tu n'existais pas, je t'aurais inventé !

Enfin je tiens à remercier tous ceux que j'ai oubliés mais qui ont été, j'en suis sûre, d'un très grand soutien ! ; )

Enfin je voudrais remercier la Région Bretagne d'avoir accepté de financer cette thèse.





# Liste des abréviations

**ADN:** Acide désoxyribonucléique

**AIF:** Apoptosis inducing factor

**AP-1:** Activator Protein 1

**Apaf-1:** Apoptotic Protease activating factor 1

**ARN:** Acide ribonucléique

**ARNm:** ARN messenger

**ARNr:** ARN ribosomique

**ATP:** Adénosine Triphosphate

**BioBaz:** Biologie Intégrée de *Bathymodiolus azoricus*

**C1qDC:** C1q domain containing

**Ct:** Threshold Cycle

**CTAB:** Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

**CTL:** C-Type Lectin

**DAP:** Acide DiaminoPimélique

**DD:** Death Domain

**DIF:** Dorsale related immunity factor

**DREDD:** Death related ced-3/Nedd2-like

**dNTP:** Déoxyribonucléotide

**FADD:** Fas-Associated protein with Death Domain

**FDR:** False Discovery Rate

**FREP:** Fibrinogen related proteins

**FOM:** Figure Of Merite

**G3P:** Glycerhaldehyde 3 Phosphate **G3PDH:** Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

**G6P:** Glucose 6 phosphate

**GO:** Gene Ontology

**HupL:** Uptake Hydrogenase Large subunit

**Imd:** Immune defieney

**IRAK:** Interleukin-1 receptor-associated kinase 1

**LRR:** Leucin Rich-Repeat

**MAMP:** Microbes Associated Molecular Pattern

**MoMARSat:** Monitoring of the Mid-Atlantic Ridge by satellite

**MIF:** Macrophage Inhibitory Factor

**MOO:** Methane MonoOxygenase

**MOX:** Methane oxidizing

**MyD88:** Myeloïde Differentiation primary response 88

**NLR:** Nod-Like Receptor

**NOD:** Nucleotide Oligomerisation Domain

**PAM:** Peptide Antimicrobiens

**PAMP:** Pathogen Associated Molecular Pattern

**PCD I:** Programmed cell death type I

**PGRP:** Peptidoglycan Recognition protein

**PRR:** Pattern Recognition Receptor

**qPCR:** Quantitative Polymerase Chain Reaction

**RLR:** Retinoic acid inducible gene-I like RNA helicases

**RuMP:** Ribulose Monophosphate Pathway

**SAM:** Significant Analysis of Microarray

**SDS:** Dodecyl Sulfate de sodium

**SPE:** Symbiotic Primary Endosymbiont

**SOX:** Sulphur Oxidizing

**TAK1:** Transforming growth factor beta-activated kinase 1

**TCA:** Acide Trichloroacétique

**TCA cycle:** Tricarboxylic Acid Cycle

**TCT:** Tracheal CytoToxin

**TIR:** Toll interleukin-1 receptor

**TLR:** Toll-Like Receptor

**TNFR:** Tumor Necrosis Factor Receptor

**Tollip:** Toll Interacting Protein

**TRAF:** TNF Receptor Associated Factor

**TTSS:** Type Three Secretion System

# Sommaire

Chapitre I.....	1
Introduction .....	1
I. La symbiose dans le monde du vivant.....	1
1. Historique et définition.....	1
2. Caractéristiques communes aux symbioses.....	3
2.1. Localisation des symbiotes.....	3
2.2. Mode de transmission.....	4
2.3. Symbioses obligatoires ou facultatives.....	6
3. Rôles biologiques des symbioses .....	6
3.1. Symbioses à rôle métabolique .....	7
3.2. Autres rôles possibles de la symbiose .....	8
4. Adaptation à la vie symbiotique .....	9
4.1. Adaptation chez l'hôte : mise en place d'organes symbiotiques, moyen de contenir les symbiotes.....	9
4.2. Adaptation chez le symbiote .....	10
II) Le symbiote, un parasite qui vous veut du bien .....	13
1. Le système immunitaire chez les invertébrés .....	13
1.1. Un modèle pour l'étude de la réponse immunitaire : <i>Drosophila melanogaster</i> .....	13
1.2. Un exemple en milieu marin : les bivalves.....	18
2. Interactions hôte-symbiotes.....	28
2.1. Reconnaissance de sa « moitié » .....	28
2.2. Régulation et maintien de la symbiose .....	32
2.3. Transfert de nutriments.....	34
III. Objectifs de thèse .....	37
IV. Modèle d'étude: <i>Bathymodiolus azoricus</i> .....	38
1. Les sources hydrothermales, un environnement instable .....	38
2. Diversité des symbioses associées aux sources.....	43
2.1. Diversité des hôtes animaux .....	43
3. Les Bathymodiolinae et <i>Bathymodiolus azoricus</i> , notre organisme d'étude.....	49
3.1. Contexte taxonomique, biogéographique et symbiotique .....	49
3.2. <i>Bathymodiolus azoricus</i> .....	50
Chapitre II .....	61
Résultats préliminaires .....	61

Chapitre III .....	89
A la recherche d'acteurs moléculaires de la symbiose chez <i>B.azoricus</i> , une approche globale.....	89
1. Protocole expérimental.....	89
2. Mesure de la charge et de l'activité symbiotique .....	93
2.1. Matériels et méthodes.....	93
2.2. Résultats .....	96
3. Approche protéomique .....	99
3.1. Protocole expérimental.....	99
3.2. Résultats .....	101
4. Approche transcriptomique .....	125
4.1. Protocole expérimental.....	125
4.2. Résultats .....	127
5. Conclusions .....	134
5.1. Impact sur le métabolisme.....	135
5.2. Impact sur le système immunitaire.....	140
5.3. Impact sur l'apoptose .....	143
5.4. Remarques finales et hypothèses.....	145
Chapitre IV .....	149
Impact de la symbiose sur le système immunitaire de <i>B. azoricus</i> , approche ciblée .....	149
I. Implication des lysozymes dans la plasticité de la symbiose .....	149
II. Identification des PGRPs chez <i>B. azoricus</i> et leurs rôles dans la symbiose.....	183
III. Rôle des processus apoptotiques dans la régulation de la charge symbiotique .....	207
Chapitre V .....	233
Conclusions et perspectives.....	233
Bibliographie.....	246
Table des illustrations.....	271
Table des tableaux .....	274

# Chapitre I

## Introduction

Les relations entre organismes sont souvent représentées comme antagonistes, dominées par trois types d'interactions : la compétition, la prédation, et le parasitisme. Ces interactions s'opposent puisque la compétition correspond à un combat pour accéder à une ressource (territoire, nourriture, reproduction), alors que la prédation correspond à une interaction directe par la consommation d'une espèce par une autre. Enfin, le parasitisme est une relation dans laquelle une espèce profite d'une autre, en lui étant nuisible. Cette représentation des relations entre organismes est toutefois incomplète. En effet, les organismes ont souvent répondu à l'influence de leur environnement (interactions antagonistes, stress abiotique etc) en développant des alliances avec d'autres organismes, augmentant ainsi leur « fitness » et leur succès écologique. L'importance de ces coopérations, pourtant reconnues depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, revêt un intérêt renouvelé aujourd'hui depuis la découverte récente du rôle prépondérant du microbiome chez la plupart des organismes multicellulaires.

## I. La symbiose dans le monde du vivant

### 1. Historique et définition

La période 1870-1880 a vu naître de nombreux ouvrages et recherches concernant la symbiose sous toutes ses déclinaisons : parasitisme, commensalisme ou mutualisme. Le Tableau 1.1 présente ces différentes modalités d'interactions durables entre espèces ainsi que leur effet sur les protagonistes de l'interaction.

Tableau 1.1: Interactions biotiques et effets sur les partenaires . +: effet positif, -: effet négatif, 0: effet neutre

	Partenaire A	Partenaire B
Compétition	-	-
Prédation	+	-
Parasitisme	+	-
Commensalisme	+	0
Mutualisme	+	+

Le débat a tout d'abord été alimenté par des questions portant sur la nature des lichens, qui sont qualifiés par certains scientifiques de l'époque, de végétaux intermédiaires. Dans ce contexte, l'originalité des travaux d'Albert-Bernhardt Frank en 1877 et d'Anton de Bary en 1879 sur le lichen les mènera à la mise en évidence et à la définition du terme symbiose. Ils l'attribuent alors au fait pour deux organismes distincts de « vivre ensemble », sans préjuger des conséquences sur l'un ou l'autre des partenaires, une définition qui englobe donc l'ensemble des modalités, du mutualisme au parasitisme. Après cette découverte relative au lichen, finalement reconnue comme une association symbiotique entre un champignon et une algue verte ou une cyanobactérie, de nombreuses autres associations symbiotiques furent mises en évidence durant le siècle qui suivit. Cette définition pionnière de la symbiose à l'époque de De Bary a cependant été amenée à évoluer et reste controversée notamment dans le domaine médical. En effet, est-il possible de décrire certaines pathologies comme des symbioses ?

J'ai pris le parti dans ce manuscrit de retenir la définition suivante : « La symbiose est une association à bénéfice réciproque, mutuel et durable entre deux individus d'espèces différentes ». Cette définition correspond à celle d'un mutualisme entre organismes physiquement étroitement associés (Selosse, 2012; Selosse 2000) et est largement répandue dans la communauté scientifique francophone. Elle reste néanmoins critiquable notamment sur l'utilisation du terme « bénéfice » de par la difficulté de mesurer les bénéfices réciproques pour les protagonistes d'une association symbiotique (Douglas 2010). La notion de symbiose au sens le plus large, préférentiellement utilisée dans le monde anglophone, peut être alors désignée par le terme générique d'interaction durable.

La symbiose n'implique pas forcément un organisme pluricellulaire, et de nombreuses associations symbiotiques ont été décrites entre organismes unicellulaires, procaryotes ou eucaryotes. Ainsi la symbiose a joué un rôle majeur dans l'évolution des eucaryotes et dans leur diversification (Roeselers and Newton, 2012). Il est en effet maintenant admis que d'anciens événements endosymbiotiques sont à l'origine de la formation des organites majeurs présents dans la cellule eucaryote, tels que la mitochondrie ou le chloroplaste (Sagan, 1967). Sans reprendre ici tout l'historique des recherches sur l'origine des Eucaryotes (voir par exemple (Koonin, 2015), la découverte toute récente d'une nouvelle lignée d'Archaea, les Lokiarchaeota, possédant certaines caractéristiques des cellules eucaryotes (Spang et al., 2015), suggère que les eucaryotes seraient bien issus de la symbiose entre l'une de ces Lokiarchaeota avec une alpha-protéobacteria, ancêtre des mitochondries.

## 2. Caractéristiques communes aux symbioses

La diversité des associations symbiotiques est d'une part liée à la diversité d'organismes capable de « vivre ensemble », et d'autre part à la diversité des environnements auxquels ceux-ci se sont adaptés. Par convention, lorsqu'au sein d'une symbiose les partenaires sont de tailles différentes, le plus petit est nommé le symbiote et le plus grand, l'hôte (Smith & Douglas 1987). Les symbioses peuvent être obligatoires, facultatives ou encore exister seulement durant une partie du cycle biologique d'un des partenaires.

### 2.1. Localisation des symbiotes

Deux types de localisation peuvent être distinguées : à l'extérieur ou à l'intérieur des cellules de l'hôte. Dans le premier cas, dénommé ectosymbiose, les symbiotes peuvent se trouver à l'extérieur de l'organisme, comme chez *Alvinella pompejana*, un ver emblématique des sources hydrothermales de la dorsale Est-Pacifique et qui vit en ectosymbiose avec des bactéries colonisant des extensions de son tégument (Cary et al., 1997; Haddad et al., 1995), ou dans certains tissus ou organes de l'hôte, comme dans le cas du microbiome humain, où les symbiotes sont présents dans la lumière du tube digestif (et non au sein des cellules épithéliales de l'intestin). Le terme d'endosymbiose est utilisé pour le second cas, et illustré chez certains cnidaires tels *Anemonia viridis*, qui abritent dans des cellules de leur gastroderme des microalgues vertes (dinoflagellés) (Sabourault et al., 2009) mais aussi chez

notre organisme d'étude *Bathymodiolus azoricus* dont les bactéries symbiotiques sont hébergées dans certaines cellules branchiales. Notons que les endosymbioses peuvent être subdivisées en deux catégories, les endocytobioses pour lesquelles les symbiotes sont contenus dans des vacuoles internalisées dans le cytoplasme et les endosymbioses extracellulaires, phénomènes plus rare, pour lesquels les symbiotes vivent entre les cellules dans la matrice extracellulaire.

## 2.2. Mode de transmission

Pour qu'une interaction soit qualifiée de durable, il faut qu'elle se reproduise d'une génération à l'autre des deux partenaires. Le mode de transmission des symbiotes revêt un caractère primordial pour comprendre l'évolution des symbioses. Dans le cas d'une transmission verticale, les histoires évolutives du symbiote et de l'hôte sont liées car la transmission se fait de génération en génération le plus souvent *via* les cellules germinales de l'hôte femelle. Il n'y a pas de renouvellement de la population de symbiotes à partir de l'environnement, les partenaires sont donc qualifiés de fidèles. Prenons l'exemple du charançon *Sitophilus oryzae* (Figure 1.1). Ses symbiotes, des bactéries Gram -, vivent chez l'adulte mâle dans le *caecum* et chez l'adulte femelle dans le *ceacum* et les ovaires. Lors de la reproduction, la fusion des gamètes mâle et femelle mène à la formation d'un œuf qui hérite d'un échantillon de la population bactérienne de la femelle (Figure 1.1). Au cours du développement embryonnaire, la population bactérienne se divise en deux parties, l'une qui s'associera aux cellules germinales, l'autre qui se localisera dans le *caecum* du futur charançon (Bright and

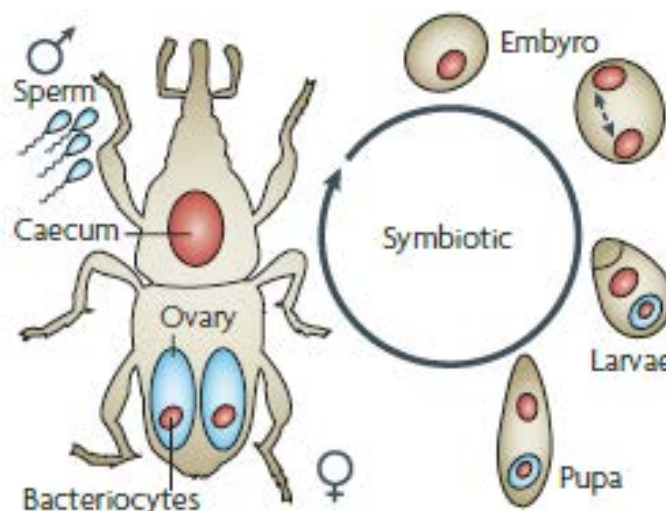


Figure 1.1 : Transmission verticale des symbiotes chez le charançon *Sitophilus oryzae*. Le symbiote principal réside dans le caecum et dans les ovaires de la femelle. Durant l'embryogenèse la population symbiotique est divisée en deux, l'une s'associera avec les cellules germinales l'autre avec le caecum. Schéma de Bright & Bulgheressi 2010



Bulgheresi, 2010).

La transmission horizontale est définie comme une transmission par contagion, puisque les symbiotes sont acquis à partir de l'environnement. Ainsi, hôte et symbiote ont chacun une phase de vie libre, en dehors de leur vie en symbiose, et donc une partie respective de leur histoire évolutive reste indépendante l'une de l'autre. L'exemple le mieux documenté est l'association entre légumineuses et Rhizobiums dans laquelle les bactéries du sol sont acquises horizontalement par les racines de l'hôte et ce à chaque génération (Vavre 2009; Lipsitch et al. 1995; (Kiers et al., 2003) (Figure 1.2). Dans le cas de la transmission horizontale, il y a donc une période du cycle de vie des hôtes durant laquelle ceux-ci sont dépourvus de symbiotes. Ils sont alors dits aposymbiotiques et acquièrent leurs symbiotes au cours de leur développement (direct ou indirect). Par exemple, l'association entre le vestimentifère *Riftia pachyptila* et les  $\gamma$ -Protéobactéries chimiotrophes *Endoriftia persephone* s'établit à la fin du stade larvaire de l'hôte, au moment du recrutement benthique du ver, *via* le tégument. Après recrutement, les bactéries migrent vers le tissu mésodermique entourant l'intestin, induisant la morphogénèse du trophosome et la disparition du tube digestif (Bright and Bulgheresi, 2010; Nussbaumer et al., 2006). Ainsi, dans le cas d'endosymbiose à transmission horizontale, il est nécessaire de mettre en place des « stratégies » de sélection des symbiotes. La réaction de l'hôte à l'infection par ses futurs symbiotes diffère de sa réaction aux autres bactéries (fourragères ou pathogènes). Cela implique une reconnaissance spécifique dont les mécanismes relèvent très probablement de la réponse immunitaire (*cf.* ci-

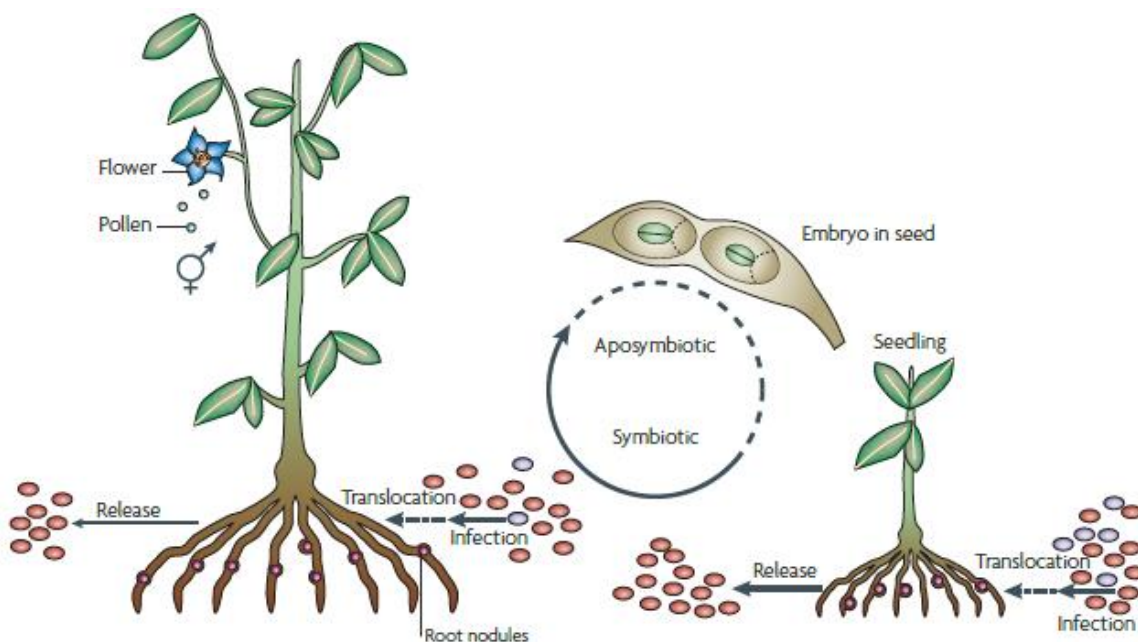


Figure 1.2: Transmission horizontale par infection des racines de *Glycine max*, une légumineuse par *Bradyrhizobium* spp. Schéma de Bright & Bulgheresi 2010

dessous).

Enfin, certaines transmissions ne sont pas strictement verticales ou horizontales mais peuvent être les deux à la fois. Celles-ci sont dites transmissions mixtes. Dans ce cas, la transmission verticale peut être perturbée par une acquisition « accidentelle » de symbiotes *via* l'environnement ou *via* un congénère, voire une espèce symbiotique proche. C'est le cas du bivalve Vesicomidae *Vesicomya* sp JdF. chez qui il a été détecté en plus du phylotype bactérien acquis de façon verticale, un autre phylotype, ne constituant que 2% de la population, et apparenté aux symbiotes d'une autre espèce de *Vesicomiya* (Stewart and Cavanaugh, 2009).

### 2.3. Symbioses obligatoires ou facultatives.

Quelque soit le mode de transmission, la dépendance réciproque de l'hôte et du symbiote est variable. Lorsque la survie des partenaires est impossible en dehors de cette association, la symbiose est dite obligatoire. C'est le cas de l'association entre la bactérie *Buchnera aphidicola* et son hôte, le puceron du pois, dont l'association est issue d'une coévolution datant de plus de 150 millions d'années. Au contraire, lorsque hôte et/ou symbiote peuvent exister indépendamment l'un de l'autre, la symbiose est qualifiée de facultative pour l'un ou l'autre des partenaires. Lorsque la bactérie est relâchée dans l'environnement, elle prend ou reprend alors une forme dite libre (Moya et al., 2008). C'est le cas de certaines bactéries symbiotiques telles que *Wolbachia* spp qui s'associent de façon non vitale à certaines espèces de pucerons. Lorsque ces deux types de symbioses sont présents au sein d'un même organisme, le symbiote obligatoire est dit primaire, et le facultatif, secondaire (Fukatsu and Ishikawa, 1998).

## 3. Rôles biologiques des symbioses

La diversité des associations symbiotiques reflète une diversité des rôles de celles-ci. Elles peuvent avoir un rôle métabolique ou trophique, l'un des partenaires fournissant une source de carbone, d'azote ou encore d'acides aminés à l'autre, mais aussi un rôle de défense vis-à-vis des prédateurs, de recherche ou d'accès à la nourriture ou encore de mobilité.

### 3.1. Symbioses à rôle métabolique

#### 3.1.1. Source de carbone

Dans la biosphère, deux mécanismes principaux permettent une production primaire de matière organique : la photosynthèse et la chimiosynthèse. . Pour un organisme hétérotrophe, comme les animaux, la symbiose peut permettre d'acquérir secondairement une forme d'autotrophie, *via* l'association avec des symbiotes phototrophes ou chimiotrophes.

La symbiose photosynthétique a été caractérisée dans divers écosystèmes en milieu terrestre, avec l'exemple emblématique du lichen, mais aussi dans le monde marin. Dans ce dernier, elle correspond généralement à l'association entre un métazoaire (Porifera, Cnidaria etc) ou un protiste hétérotrophe et une cyanobactérie ou une microalgue (Balzano et al., 2015; Venn et al., 2008). Un autre exemple, d'intérêt écologique majeur est celui des récifs coralliens. Ceux-ci vivent dans des zones tropicales, oligotrophes et se sont associés aux algues du genre *Symbiodinium*. Celles-ci convertissent le dioxyde de carbone en carbone organique et en oxygène, en utilisant l'énergie lumineuse, permettant ainsi aux coraux de croître (Roth, 2014).

Dans les écosystèmes de type chimiosynthétique, tels que les sources hydrothermales de l'océan profond, l'absence de lumière rend impossible toute production primaire issue de la photosynthèse. Cependant, les sources hydrothermales constituent un oasis où prospère de nombreux invertébrés. Ils vivent pour la majorité d'entre eux en association symbiotique avec des bactéries chimioautotrophes. Ces dernières oxydent les composés réduits issus du fluide hydrothermal et utilisent cette énergie chimique pour fixer le carbone inorganique et fournir des substrats organiques à leur hôte. Les symbioses chimiosynthétiques sont également fréquentes dans les sédiments réduits, les carcasses de baleines, les bois coulés ainsi qu'au niveau des suintements froids (Dubilier et al., 2008). Par exemple, dans les bois coulés, le mollusque polyplacophore *Leptochiton boucheti* vit en symbiose avec des bactéries présentes dans son intestin et sa glande digestive (Duperron et al., 2013). Les symbioses dans les environnements chimiosynthétiques sont assez diverses, elles peuvent être simples, multiples, intracellulaires ou non, à transmission horizontale ou verticale (Kuwahara et al. 2007; Newton et al. 2007) offrant ainsi une palette de modèles d'étude aux caractéristiques contrastées.

#### 3.1.2. Source d'azote

L'azote est une ressource quasi-illimitée dans l'atmosphère mais les sols sont plutôt dépourvus des formes directement assimilables comme l'ammonium ou le nitrate, limitant la croissance des végétaux. Cependant, deux groupes de plantes ont la capacité de s'associer symbiotiquement avec des bactéries capables de réduire l'azote gazeux ( $N_2$ ) en ammoniac ( $NH_3$ ) qui est à son tour transformé en ammonium ( $NH_4^+$ ) assimilable par la plante. Les légumineuses s'associent à des rhizobia et certaines familles d'Angiospermes s'associent à l'actinomycète *Frankia*. L'association légumineuse/Rhizobia est emblématique des symbioses fixatrices d'azote (Wang et al., 2012a). Mais ces plantes ne sont pas les seuls organismes capables de mettre en place des associations symbiotiques fixatrices d'azote. En milieu marin, de telles associations symbiotiques ont été observées entre le bivalve xylophage *Lyrodus pedicellatus* de la famille des Teredinidae et des bactéries (de type  $\gamma$ -protéobactéries) fixatrices d'azote, vivant dans les branchies et lui permettant d'avoir accès à cet élément en dépit d'un régime carencé (Distel et al., 1991, 2002).

### 3.1.3. Source d'acides aminés

Beaucoup d'animaux sont incapables de synthétiser l'ensemble des acides aminés essentiels à leur croissance. La plupart les trouvent dans leur nourriture, mais des régimes trophiques particuliers peuvent être carencés en certains de ces acides aminés essentiels. Une association symbiotique avec des procaryotes capables de leur apporter ces nutriments est alors indispensable. C'est le cas du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* qui vit en endosymbiose avec des  $\gamma$ -protéobactéries *Buchnera aphidicola*. Ces endosymbiotes produisent en abondance du tryptophane, absent de la sève consommée par le puceron (Baumann et al., 1995; Rouhbakhsh et al., 1996).

## 3.2. Autres rôles possibles de la symbiose

Comme il a été dit précédemment, la symbiose est présente dans le monde vivant sous de nombreuses formes aux fonctions et rôles diversifiés. Un autre exemple de la diversité fonctionnelle des symbioses est la bioluminescence. Celle-ci est souvent rencontrée en milieu marin pour chercher de la nourriture, trouver un partenaire ou éviter les prédateurs. L'association entre la sépiole *Euprymna scolopes* et la bactérie bioluminescente *Aliivibrio fischeri*, un des exemples de bioluminescence marine les plus étudiés, permet à l'hôte d'éviter les prédateurs et aux bactéries d'avoir un environnement idéal pour croître (Widder, 2010).

Un second exemple de diversité fonctionnelle est observable au sein de l'intestin des mammifères. Au-delà d'un rôle dans l'absorption des nutriments, ou dans la synthèse de composés essentiels, le microbiome possède un important rôle de défense (détoxification et neutralisation) face aux micro-organismes nocifs pour l'hôte (Leser and Mølbak, 2009).

## 4. Adaptation à la vie symbiotique

Le mode de vie symbiotique, *a fortiori* lorsqu'il s'agit d'endosymbioses à caractère obligatoire, impose un certain nombre d'adaptations tant chez l'hôte que chez le symbiote, permettant leur reconnaissance et leur acceptation mutuelle ainsi qu'une allocation des ressources bénéfiques aux deux partenaires.

### 4.1. Adaptation chez l'hôte : mise en place d'organes symbiotiques, moyen de contenir les symbiotes

Si d'un point de vue génomique et génétique, nous connaissons encore très peu l'impact de la symbiose sur l'hôte, d'autres adaptations ont été notées et en premier lieu les adaptations morphologiques. En effet, les symbiotes sont accueillis soit au sein d'organes spécialisés, soit dans le cas d'endosymbioses, de cellules spécialisées. Le puceron du pois possède des cellules spécialisées appelées mycetocytes présentes dans l'hémocèle et contenant le symbiote *Buchnera*. Les mycetocytes ne se divisent pas au cours de la vie du puceron, mais augmentent en taille au fur et à mesure que les symbiotes se divisent (Douglas, 1998).

Les moules de la famille des Bathymodiolinae ayant colonisé les abords des sources hydrothermales et suintements froids, vivent en symbiose avec des bactéries chimiosynthétiques. Ces dernières sont hébergées dans des cellules branchiales spécialisées appelées bactériocytes (Distel et al., 1995; Duperron et al., 2006).

D'autres adaptations se font à l'échelle du tissu ou de l'organe. Par exemple, chez certains hôtes, la colonisation de bactéries symbiotiques induit la formation d'un organe spécialisé pour l'accueil des symbiotes. Ainsi, durant l'embryogenèse chez la sépiole *E. scolopes* un organe lumineux dépourvu de symbiotes se met en place. Il présente trois pores menant à des diverticules épithéliaux. Après éclosion, la bactérie *V. fischeri* va coloniser l'organe lumineux,

induisant une morphogenèse de celui-ci. Les cellules des glandes épithéliales vont se différencier à nouveau, devenant des cellules carrées d'un volume quatre fois supérieur à leur taille initiale (Ruby, 1996).

Un autre exemple, est celui du vestimentifère *Riftia pachyptila*, emblématique des sources hydrothermales du Pacifique est et dont les bactéries symbiotiques sont « vacuolisées » dans des cellules mésodermiques du trophosome (organe symbiotique, *cf.* plus haut) (Nussbaumer et al., 2006). Dans ce cas, les symbiotes sont à la fois dans des cellules spécialisées et dans un organe spécialisé (Bright et al., 2000).

Ainsi, dans la grande majorité des symbioses, le lieu de vie des symbiotes est restreint à un organe ou tissu et absent du reste de l'organisme. Cette restriction suggère un rôle potentiel du système immunitaire. De plus, la majorité des symbioses nécessitent de la part de l'hôte une capacité à sélectionner les « bons » partenaires et à rejeter les « mauvais ». L'implication de l'immunité dans la symbiose a été particulièrement étudiée chez les invertébrés, notamment chez les insectes et les mollusques (voir partie II).

### 4.2. Adaptation chez le symbiote

L'adaptation des bactéries à la vie symbiotique a, dans le cas de transmissions verticales, induit une réduction importante de leur génome. Cette réduction a tout d'abord été observée chez le symbiote du puceron du pois en 2000, et a été observée ensuite chez la majorité des bactéries symbiotiques (Shigenobu et al., 2000). En effet, la comparaison des génomes des bactéries libres et de leurs homologues symbiotiques montre le plus souvent une réduction d'un facteur 5 chez ces dernières (Moran et al., 2008). Les gènes perdus lors de cette réduction appartiennent à de nombreuses catégories fonctionnelles, mais plus particulièrement à des processus essentiels tels que la traduction, la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN (McCutcheon and Moran, 2012). Les gènes perdus peuvent également dépendre du type d'association symbiotique. Par exemple, chez les symbiotes hébergés dans des vacuoles au sein des bactériocytes, de nombreux gènes impliqués dans la formation de l'enveloppe cellulaire ont été perdus au cours de l'évolution (Shigenobu et al., 2000). Dans la relation puceron du pois/*Buchnera*, le symbiote a perdu les gènes codant pour des acides aminés non essentiels au puceron.

Parmi les gènes conservés par les bactéries, se retrouvent ceux codant pour les protéines de stress et les protéines chaperonnes, ainsi que les protéines nécessaires au métabolisme de l'hôte et aux interactions avec ce dernier (Shigenobu et al. 2000; Fares et al 2002).

D'autres adaptations du génome ont eu lieu au cours de l'évolution telles que l'augmentation du ratio A + T vs G + C (Hershberg and Petrov, 2010). La teneur en GC au sein des génomes de bactéries est très variable, allant de moins de 20% à 70% (Hildebrand et al., 2010), mais il a été noté une diminution de ce ratio chez les bactéries symbiotiques comparé à leurs homologues libres (McCutcheon and Moran, 2012). En effet, chez la  $\beta$ -protéobactérie *Ca.Zindera insecticola*, le ratio est particulièrement affecté avec une très faible composition en GC, de 13,5% (McCutcheon and Moran, 2012), tandis que certaines bactéries non symbiotiques telles que *Anaeromyxobacter dehalogens* ont un contenu en GC proche de 70%. De nombreuses hypothèses ont été formulées pour rendre compte de cet enrichissement en AT. Certaines ont invoqué un phénomène de sélection, d'autres un nombre de mutation en AT plus importants dû en amont à la perte de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN menant à un biais en faveur des bases AT (Lind and Andersson, 2008; Rocha and Danchin, 2002). Enfin, la réduction du génome de ces bactéries symbiotiques pourrait elle aussi être à l'origine d'un génome plus riche en AT. Quoiqu'il en soit, la réduction de la taille du génome ainsi que la modification du ratio AT/GC atteste du caractère évolutif des associations symbiotiques.

Enfin, si les phénomènes de coévolution existent dans plusieurs types d'interactions entre espèces, telles que les interactions proie/prédateur ou hôte/parasite, ils sont particulièrement importants dans les associations symbiotiques. De nombreuses études sur les insectes (Chen et al., 1999; Kikuchi et al., 2009; Thao and Baumann, 2004; Wu et al., 2006) observent des changements évolutifs réciproques entre hôte et symbiotes. La haute spécificité des interactions hôte/symbiote ainsi que la transmission verticale chez une grande majorité des symbioses insecte/bactérie, ont mené au cours du temps à cette coévolution. Des analyses phylogénétiques menées chez les punaises de la famille des Acanthosomatidae montrent que la phylogénie des symbiotes suit celle de l'hôte, indiquant ainsi une association stable et intime à l'échelle évolutive (Kikuchi et al., 2009) (Figure 1.3). Enfin, il existe dans certaines associations un transfert de gène du symbiote vers l'hôte (e.g. association *Wolbachia*/insecte) comparable aux transferts qui se sont produits entre les organites et le noyau de la cellule eucaryote (Dunning et al. 2007).

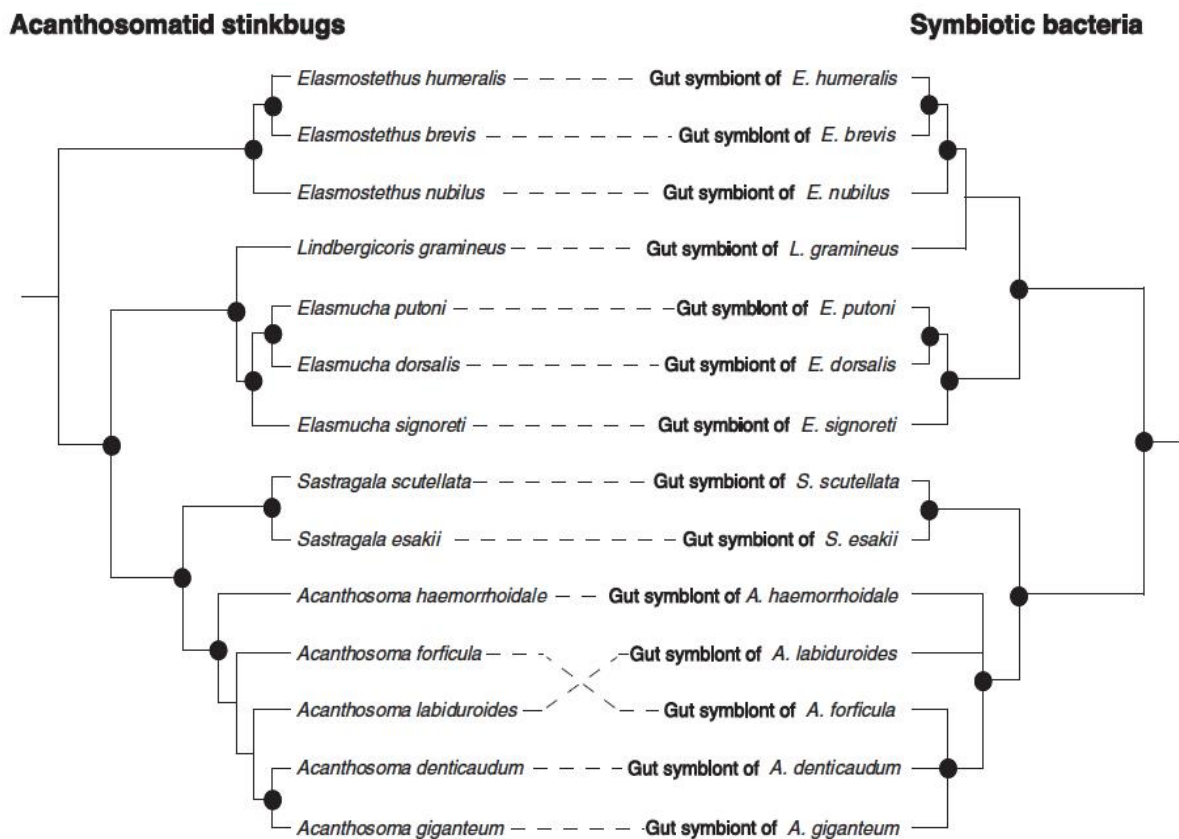


Figure 1.3: Congruence phylogénétique entre les punaises Acanthosomatidae et leur bactéries symbiotiques. A gauche, arbre phylogénétique de l'hôte, et à droite celui des symbiotes. Les hôtes sont liés à leur bactéries symbiotique par des pointillés. D'après Kikuchi *et al* 2009

Dans cette partie, nous avons décrit les principales caractéristiques et généralités sur les symbioses, de la genèse de ce terme aux différents types de symbioses rencontrées dans le monde du vivant en passant par leur évolution. Ces généralités soulèvent de nombreuses questions. Comment se déroulent les interactions entre hôte et symbiotes ? Comment se fait la rencontre entre les partenaires, et comment s'établit et se maintient cette association hautement spécifique ? Dans la partie suivante, nous nous intéresserons aux mécanismes moléculaires qui sous-tendent les interactions hôte-symbiotes, et à la capacité de l'hôte à accepter le non-soi.



## II) Le symbiote, un parasite qui vous veut du bien

Le système immunitaire est défini de façon générale comme un moyen de l'organisme de combattre les pathogènes. Harvill (2013) propose une vue alternative. Se basant sur le fait que la majorité des organismes multicellulaires possède un microbiome, il suggère que notre vision du système immunitaire est incomplète. Il propose ainsi que les mécanismes de l'immunité n'ont pas pour unique rôle de lutter contre les invasions pathogènes mais aussi (et surtout) de maintenir un microbiome en bonne santé et en association étroite avec l'hôte (Harvill, 2013). Dans cette perspective, les divers exemples de symbioses décrits auparavant ne seraient que des phénomènes exacerbés de relations mutualistes ubiquitaires.

Dans cette deuxième partie, nous allons tout d'abord nous intéresser au système immunitaire des invertébrés et notamment aux mécanismes moléculaires inhérents à ce système pour mieux comprendre dans un second temps les interactions moléculaires entre hôte et symbiotes.

### 1. Le système immunitaire chez les invertébrés

D'abord étudiés chez l'homme, la mise en évidence des mécanismes de réponse aux pathogènes date de la découverte de Edward Jenner qui au XVIII<sup>ème</sup> siècle observa que la variole bovine pouvait induire une protection contre la variole humaine. La réaction induite par un pathogène est appelée réaction immunitaire, se décompose en deux parties chez les vertébrés : l'immunité innée, première ligne de défense, et l'immunité adaptative ou spécifique, permettant la production d'anticorps contre un pathogène particulier (Janeway et al., 2009). Les invertébrés possèdent seulement une immunité innée qui, comme chez les vertébrés, fait intervenir des récepteurs et des acteurs intracellulaires qui interagissent les uns avec les autres *via* des cascades de transduction du signal produisant *in fine* une réponse défensive. L'immunité innée est phylogénétiquement plus ancienne que l'immunité acquise et existe chez tous les métazoaires. Ici nous allons décrire la réaction immunitaire chez deux types d'invertébrés : les insectes représentés par l'organisme modèle *Drosophila melanogaster* et les bivalves de façon générale, groupe comprenant notre organisme d'étude.

#### 1.1. Un modèle pour l'étude de la réponse immunitaire : *Drosophila melanogaster*

La mouche du vinaigre est un très bon modèle d'étude en laboratoire, notamment en génétique et biologie du développement, de par la possibilité d'élevage, sa petite taille et son cycle de vie court. De nombreux outils et techniques moléculaires peuvent être utilisés sur cet organisme et permettent *via* l'utilisation de mutants, de connaître la fonction des gènes impliqués par exemple dans l'immunité.

L'immunité innée de la drosophile fait principalement appel à deux types de réponses : une réponse humorale et une réponse cellulaire qui mènent à la destruction des pathogènes par des peptides lytiques (Hoffmann and Reichhart, 2002).

### 1.1.1. La réponse humorale

La réponse humorale consiste d'une part en l'activation de cascades protéolytique et d'autre part, en la production de peptides antimicrobiens (PAMs ou AMPs en anglais) (Elrod-Erickson et al., 2000). Ces derniers sont, chez *D. melanogaster*, produits dans le corps gras et secrétés dans l'hémolymph (Hoffmann et al., 1996; Meister et al., 1997). De plus, des études génétiques ont mis en évidence qu'au moins deux voies de régulation, indépendantes et adaptées à la nature des microorganismes infectieux, existent chez la drosophile : les voies Toll et Imd (Lemaitre, 2004; Lemaitre et al., 1995).

#### a. La voie Toll

Cette voie est activée lors d'une infection fongique ou par des bactéries de types Gram +. Toll est un récepteur membranaire composé d'une région extracellulaire contenant des domaines LRR (Leucine Rich Repeat) et d'une région intracellulaire possédant une grande similitude de séquence avec IL-1R (interleukin 1 receptor) et appelée domaine TIR (Toll-IL-1R) (Hashimoto et al., 1988). Le domaine TIR interagit avec des partenaires cytoplasmiques ayant tous une région « death domain » (DD). MyD88 (Myeloïde Differentiation primary response 88) (Horng et al., 2001) possède un DD et va activer la cascade agissant sur Tube (Letsou et al., 1991) et la protéine kinase Pelle (Shelton and Wasserman, 1993). S'ensuit la phosphorylation et la dégradation de Cactus (Kidd, 1992), un inhibiteur du facteur de transcription DIF (Dorsale Related Immunity Factor) (Ip et al., 1993), induisant la translocation de celui-ci dans le noyau et la production de peptides antimicrobiens tel que la drosomycine. Le facteur de transcription DIF appartient à la famille des protéines Rel associant ainsi la voie Toll à la voie NF- $\kappa$ B (Hoffmann and Reichhart, 2002) (Figure 1.4).

Une seconde voie de réponse aux infections existe chez la drosophile qui comme pour la voie Toll aboutie à la voie NF-  $\kappa$ B pour la transcription de peptides antimicrobiens, c'est la voie Imd.

### b. La voie Imd

La voie Imd (Immune deficiency) gouverne la réponse aux infections par les bactéries Gram -. De même que pour la voie Toll, l'infection induit une cascade de transduction impliquant des protéines de la famille Rel et menant à la synthèse de peptides antimicrobiens. La voie Imd est activée par reconnaissance de peptidoglycanes de type DAP (Acide DiaminoPimélique) des bactéries *via* un récepteur transmembranaire PGRP-LC (Peptidoglycan Recognition Protein). Ce récepteur est associé à la protéine IMD qui interagit avec la caspase DREDD (Death related ced-3/Nedd2-like) (Georgel et al., 2001; Leulier et al., 2000) *via* la protéine FADD (Fas-Associated protein with Death Domain). DREDD clive IMD et Relish, s'ensuit une activation d'une cascade de kinase menant à la phosphorylation, l'activation et la translocation dans le noyau de Relish et/ou AP-1 (Activator Protein 1). Ces derniers activent la transcription de peptides antimicrobiens tels que la diptericine (Lemaitre 2004) (Figure 1.4).

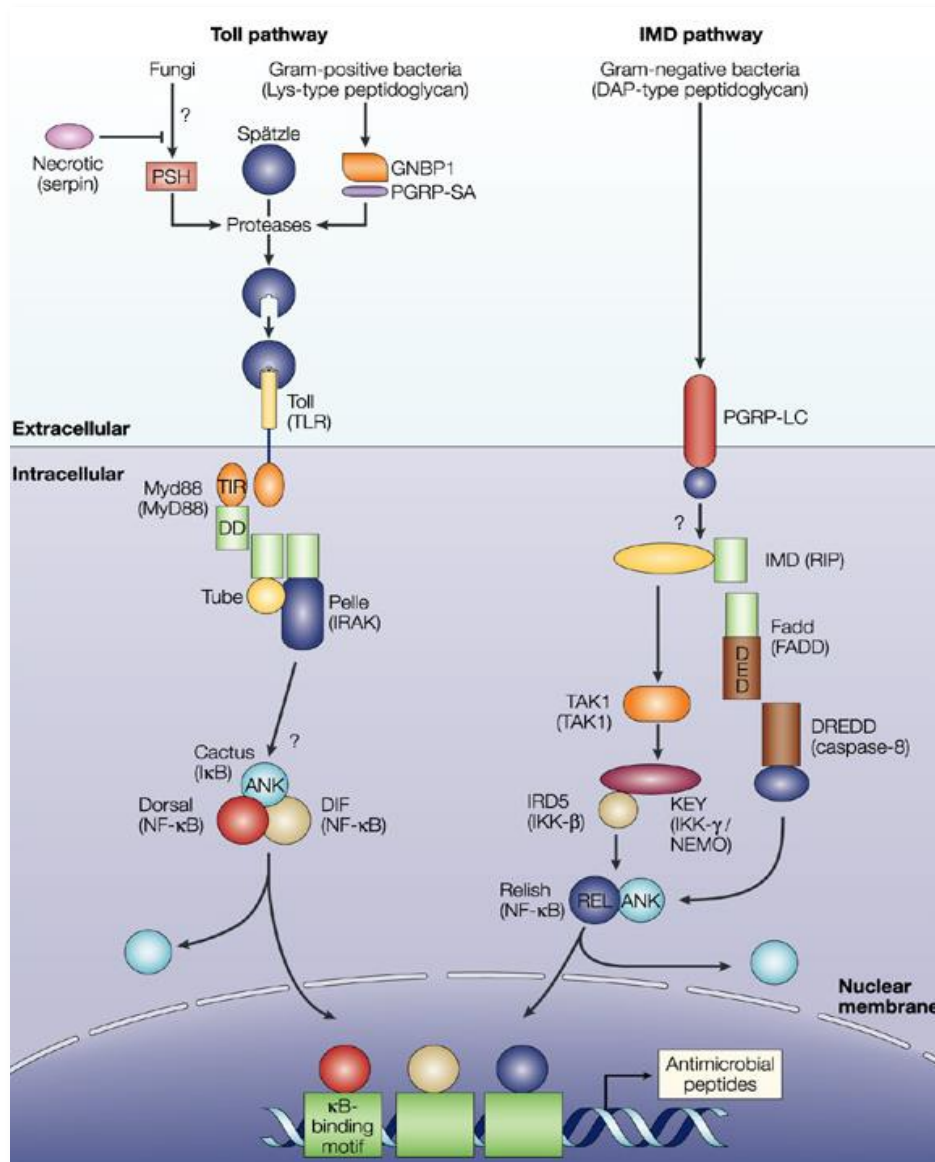


Figure 1.4: Les voies Toll et Imd chez la drosophile. Figure de Lemaitre 2004.

### c. Diversité des PAMs

Deux peptides antimicrobiens de la drosophile ont déjà été mentionnés: la diptericine et la drosomycine. Ce ne sont cependant pas les seuls PAMs produits par le diptère. Plus généralement, les insectes représentent une des sources principales de production des PAMs (Yi et al., 2014). Le Tableau 1.2 présente les différents peptides antimicrobiens identifiés chez *Drosophila melanogaster*.

Tableau 1.2: Peptides antimicrobiens chez *Drosophila melanogaster*. Nom, activité antimicrobienne, et nombre de gènes dans le génome. Adapté de Lemaitre & Hoffman 2007.

PAMs	activité	Nombre de gènes
Diptericine	Bactéries gram-négatives	2
Attacine	Bactéries gram-négatives	4
Drosocine	Bactéries gram-négatives	1
Cecropine	Bactéries gram-négatives	4
Defensine	Bactéries gram-positives	1
Drosomycine	champignons	7
Metchnikowine	champignons	1

La réponse immunitaire humorale est donc divisée en deux voies distinctes mais qui utilisent toutes deux finalement la voie NF- $\kappa$ B pour aboutir à la synthèse des peptides antimicrobiens dont l'action ciblera un type d'agent infectieux (Table 1.2). Cependant, une autre réponse immunitaire intervient lors d'une infection permettant de détruire les pathogènes au sein des cellules ou de détruire les cellules infectées de l'organisme, c'est la réponse cellulaire.

### 1.1.2. La réponse cellulaire

La réponse immunitaire cellulaire est gérée par les cellules sanguines circulantes appelées hémocytes. Ces cellules vont induire la phagocytose ou l'encapsulation des organismes pathogènes (Lackie, 1988; Strand & Pech, 1995; Gillespie et al 1997; Irving et al 2005). Trois types d'hémocytes existent chez la drosophile, les plasmotocytes qui représentent 90 à 95% des hémocytes matures, les cellules de cristal (5% de la population d'hémocytes) et les lamellocytes, présents seulement en cas d'infection (Evans et al., 2003; Lanot et al., 2001). Les plasmocytes sont spécialisés dans la phagocytose de pathogènes ou de cellules mortes, tandis que les lamellocytes sont responsables de l'encapsulation des parasitoïdes ou de corps étrangers de grande taille (Strand, 2008).

Lors du processus de phagocytose, le plasmotocyte se lie à la cible pathogène grâce à des récepteurs particuliers formant le phagosome. S'ensuit un engloutissement de la cible et une

maturation du phagosome par fusion et fission avec des endosomes et lysosomes (Stuart and Ezekowitz, 2005). Cette dernière étape conduit à la lyse des organismes phagocytés sous l'action de plusieurs enzymes lysosomiques (Bayne 1990).

L'encapsulation correspond à l'adhésion de plusieurs hémocytes, en majorité des lamellocytes, à des envahisseurs de grande taille qui sont trop gros pour être phagocytés. A la fin de cette encapsulation, des enzymes sont libérées à la surface des particules ou des envahisseurs exogènes et des zones de mélanisation sont alors observables.

Bien que souvent décrites comme deux réponses distinctes de l'immunité innée, les réponses humorale et cellulaire sont étroitement liées puisque de nombreux facteurs humoraux régulent l'activité des hémocytes et *vice-versa* (Elrod-Erickson et al., 2000).

Dans cette partie nous avons décrit brièvement le système immunitaire de la drosophile à la lumière de la vaste littérature existant sur le sujet. Cependant, les mécanismes de l'immunité, bien que très proches, sont un peu différents chez d'autres invertébrés, notamment ceux vivants dans les écosystèmes marins. En effet, la drosophile représente l'aboutissement d'une lignée évolutive bien particulière, les insectes, ou Ecdysozoaires terrestres. Dans la prochaine partie, nous détaillerons le système immunitaire d'un groupe de Lophotrochozoaires, les Mollusques Bivalves, dont fait partie notre organisme d'étude. L'immunité au sein des lophotrochozoaires a été étudiée principalement au sein des annélides (Cooper et al., 2001; Salzet et al., 2007) et des bivalves. Des études récentes exploitant les données de séquence issues de transcriptomes, de plus en plus nombreuses, promettent une extension rapide des connaissances sur les voies immunitaires dans divers taxons de Lophotrochozoa (Halanych and Kocot, 2014; Rauta et al., 2014).

### 1.2. Un exemple en milieu marin : les bivalves

L'immunité des bivalves est de plus en plus étudiée aujourd'hui notamment dans le cas des huîtres et des moules, espèces qui présentent un intérêt économique certain.

Nous allons décrire ici la diversité des acteurs de l'immunité rencontrés chez les bivalves, acteurs dont les fonctions ne sont pas toujours bien connues. Il ne sera pas fait dans cette partie de distinction entre réponse humorale et réponse cellulaire, ces dernières étant étroitement liées.

### 1.2.1. Les récepteurs PRRs (Pattern Recognition Receptor)

Les récepteurs de l'immunité chez les bivalves sont soit associés à la membrane, soit cytosoliques, soit présents à l'extérieur de la cellule ou dans le mucus (on parlera alors de récepteurs extracellulaires). Les PRRs sont la première ligne de défense contre les pathogènes puisqu'ils reconnaissent des MAMPs (Microbes Associated Molecular Pattern) ou PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern), molécules produites par les symbiotes ou pathogènes et déclenchant une cascade de signalisation.

#### a. Récepteurs extracellulaires

-Les lectines

La majorité des récepteurs extracellulaire chez les bivalves sont des lectines qui ont pour rôle l'opsonisation et l'agglutination des pathogènes, favorisant ainsi leur phagocytose. Les lectines de types C (C-type lectines, CTL) sont connues dans le monde animal pour être impliquées dans de nombreux processus incluant la reconnaissance de pathogènes (Yang et al., 2011). Chez la palourde *Ruditapes philippinarum*, la surexpression d'une lectine de type C a été observée dans les hémocytes après une injection bactérienne de *Vibrio tapetis* (Kim et al., 2008). Cette même expérience a été conduite chez la moule hydrothermale *Bathymodiolus azoricus* et une surexpression de lectine de type C a été également observée (Bettencourt et al., 2014). Les galectines représentent une sous-famille de lectines. Elles ont été décrites chez les mollusques bivalves comme étant des PRRs (Bao et al., 2013; Song et al., 2011; Yang et al., 2011; Zhang et al., 2011) mais aucune donnée fonctionnelle n'est encore disponible contrairement aux Fibrinogen RElated Proteins (FREPs) communément perçus comme les lectines de l'hémolymphe. Découvertes en 1997, les FREPs ont longtemps été considérées comme étant impliquées dans l'agglutination (Adema et al. 1997). Mais, en 2011, Romero et collaborateurs, ont fait subir à des moules *Mytilus galloprovincialis* une injection bactérienne, et ont observé une surexpression des FREPs associée à des propriétés d'opsonisation (Romero et al., 2011). Les lectines de types F et R ont été très peu étudiées chez les bivalves. En effet, seules deux lectines de type F ont été observées comme jouant un rôle dans la reconnaissance

des PAMPS chez *Pinctada spp.* (Anju et al., 2013). Récemment, une lectine de type R a été identifiée chez *Crenomytilus grayanus* comme ayant une activité anti-bactérienne (Kovalchuk et al., 2013).

### -Protéines contenant un domaine C1q (C1qDC)

Les protéines C1qDC représentent la classe de PRRs la plus diversifiée parmi les bivalves (Gerdol and Venier, 2015). La fonction immunitaire des protéines à domaine C1q est encore très peu connue bien qu'elles aient été observées chez *M. edulis* dans la cavité palléale dès 2001 (Hattan et al., 2001). Cependant, Gestal et collaborateurs ont montré en 2010 qu'une injection bactérienne chez *Mytilus galloprovincialis* induisait une forte augmentation de la transcription des protéines à domaine C1q. Ce même constat a plus récemment été effectué chez *Mytilus coruscus* par Liu et co-auteurs en 2014 (Gestal et al., 2010; Liu et al., 2014).

### b. Les récepteurs cytosoliques

Récemment, des « senseurs » intracellulaires ont été identifiés chez les bivalves. Ils ont pour la plupart un rôle de détection des bactéries ou autres pathogènes qui ont réussi à passer les barrières de la cellule et se retrouvent dans le cytosol. Les NLRs (NOD-like receptor) détectent particulièrement les molécules dérivées du peptidoglycane présentes à l'intérieur de la cellule (Barbé et al., 2014). Les NLRs sont présents chez la majorité des métazoaires, mais aucun n'a été identifié chez les bivalves. L'hypothèse de leur présence chez *M. edulis* a toutefois été formulée en 2011 (Lange et al., 2011). Les RLRs (retinoic acid inducible gene-I like RNA helicases) ne sont pas présents chez la drosophile mais ont été identifiés chez les cnidaires, les échinodermes et les bivalves, suggérant une origine ancienne de ces protéines (Zou et al., 2009). Elles sont impliquées dans une réponse antivirale menant à la production de facteurs pro-inflammatoires tels que les cytokines (Loo and Gale, 2011).

### c. Récepteurs associés à la membrane

Les PGRPs (PeptidoGlycan Recognition Protein) reconnaissent spécifiquement le peptidoglycane. Toutes les PGRPs ne sont pas des récepteurs membranaires, certaines sont présentes dans le cytosol et d'autres sont sécrétées. Ces dernières peuvent être longues (L) ou courtes (S) et posséder ou non une activité amidase (Royet et al., 2011). L'activité amidase permet l'hydrolyse de la paroi bactérienne induisant la mort de la bactérie (Mellroth et al 2003). Quelles soient ou non membranaires, les PGRPs sont associées à la voie Imd et ont été



observées chez de nombreux bivalves (Itoh and Takahashi, 2008; Ni et al., 2007; Wei et al., 2012). Chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, six séquences de PGRPs ont été identifiées dans la banque d'ADNc (Itoh and Takahashi, 2008). Certaines isoformes sont ubiquitaires et d'autres tissu-spécifiques. Par exemple l'isoforme CgPGRP-S1S est exprimée seulement dans les branchies et le manteau. Ces deux tissus constituant la première barrière de l'organisme face à l'environnement extérieur, il semble nécessaire que l'organisme y développe des systèmes de reconnaissance de pathogènes. Contrairement à d'autres bivalves, toutes les isoformes de PGRPs identifiées chez *C. gigas* possèdent à la fois une activité amidase et une capacité de reconnaissance du peptidoglycane (Itoh and Takahashi, 2008). Enfin, des expériences fonctionnelles ont été menées chez la moule de méditerranée *M. galloprovincialis* ainsi que chez la moule hydrothermale *B. azoricus*. Étonnement ceux-ci montrent une surexpression d'une PGRP 12h et 24h après un challenge bactérien chez *M. galloprovincialis* et aucun impact de ce challenge chez *B. azoricus* (Martins et al., 2014). Martins et collaborateurs émettent alors l'hypothèse selon laquelle la présence de symbiotes chez *B. azoricus* induirait une régulation des gènes de l'immunité différente des espèces non symbiotiques.

Les **TLRs** (Toll Like Receptor), appelés ainsi en référence aux récepteurs Toll découverts chez la drosophile, comptent parmi les PRRs les plus présents de la réponse immunitaire chez les métazoaires (Leulier et al., 2006). Tout comme chez la drosophile, les TLRs sont composés d'une région intracellulaire (TIR : Toll interleukin-1 receptor), d'une région transmembranaire et enfin d'une région extracellulaire contenant des domaines LRR (Leucine Rich Repeat) (Gerdol and Venier, 2015). Chez la moule *M. galloprovincialis*, 23 TLRs ont été identifiés au sein du transcriptome et regroupés en 4 clusters. Les expériences d'injection bactérienne chez cette même espèce ont montré une surexpression d'un seul TLR en réponse à l'inoculation de bactéries Gram + (Toubiana et al., 2013, 2014).

Notons que d'autres types de PRRs membranaires existent chez les bivalves tels que les « scavengers receptors » qui auraient plusieurs rôles allant de la détection et la liaison aux lipoprotéines, au transport cellulaire et à l'élimination de pathogènes (Canton et al., 2013). Cependant, seuls les récepteurs de type PGRPs et TLRs sont liés aux deux principales voies de production de peptides antimicrobiens chez les bivalves : les voies Toll et Imd. Sont-elles identiques chez *D. melanogaster* et chez les bivalves ? Que connaissons-nous des acteurs de ces deux voies chez les bivalves ?

## 1.2.2. Voies Toll et Imd chez les bivalves

### a. La voie Toll

Chez les bivalves comme chez la drosophile, la voie Toll est caractérisée par des récepteurs de type Toll qui activent une cascade de réactions menant à la synthèse de peptides antimicrobiens que nous décrirons dans la partie suivante (figure 1.5). Chez la moule de méditerranée *M. galloprovincialis* où 23 TLRs ont été identifiés, ont également été identifiés 3 protéines Myd88 qui se lient aux régions intracellulaires (TIR) des TLRs. De plus, les protéines TOLLIP, IRAKs, TRAFs, TAK1, IKK, IKK $\gamma$ /NEMO, I $\kappa$ B, Relish/p65 et la voie Nf- $\kappa$ B ont été identifiés chez *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, et *C. gigas* (Toubiana et al., 2013, 2014). Ces protéines, bien que nommées différemment, semblent avoir les mêmes propriétés que leurs homologues chez la drosophile, faisant de la voie Toll une voie très conservée entre les insectes et les bivalves. De nombreuses questions restent cependant en suspens, à savoir quels sont les PAMPs spécifiquement reconnus par ces TLRs? Existe-t-il des TLRs spécifiques de certains tissus ? (Gerdol and Venier, 2015) (Figure 1.5).

### b. La voie Imd

La présence de la voie Imd chez les bivalves est incertaine pour Toubiana et collaborateurs et ce, malgré la présence de PGRPs membranaires chez nombre d'entre eux. Ce doute est basé sur l'absence de l'adaptateur IMD/RIP qui, chez la drosophile, agit en aval de la reconnaissance des PAMPs ou MAMPs par les PGRPs membranaires. Cependant, d'autres données, telles que la présence des protéines FADD, DREDD ainsi que les protéines associées à la voie NF- $\kappa$ B, auraient au contraire tendance à renforcer l'hypothèse d'une voie Imd chez les bivalves (Gerdol and Venier, 2015; Toubiana et al., 2014) (Figure 1.5).

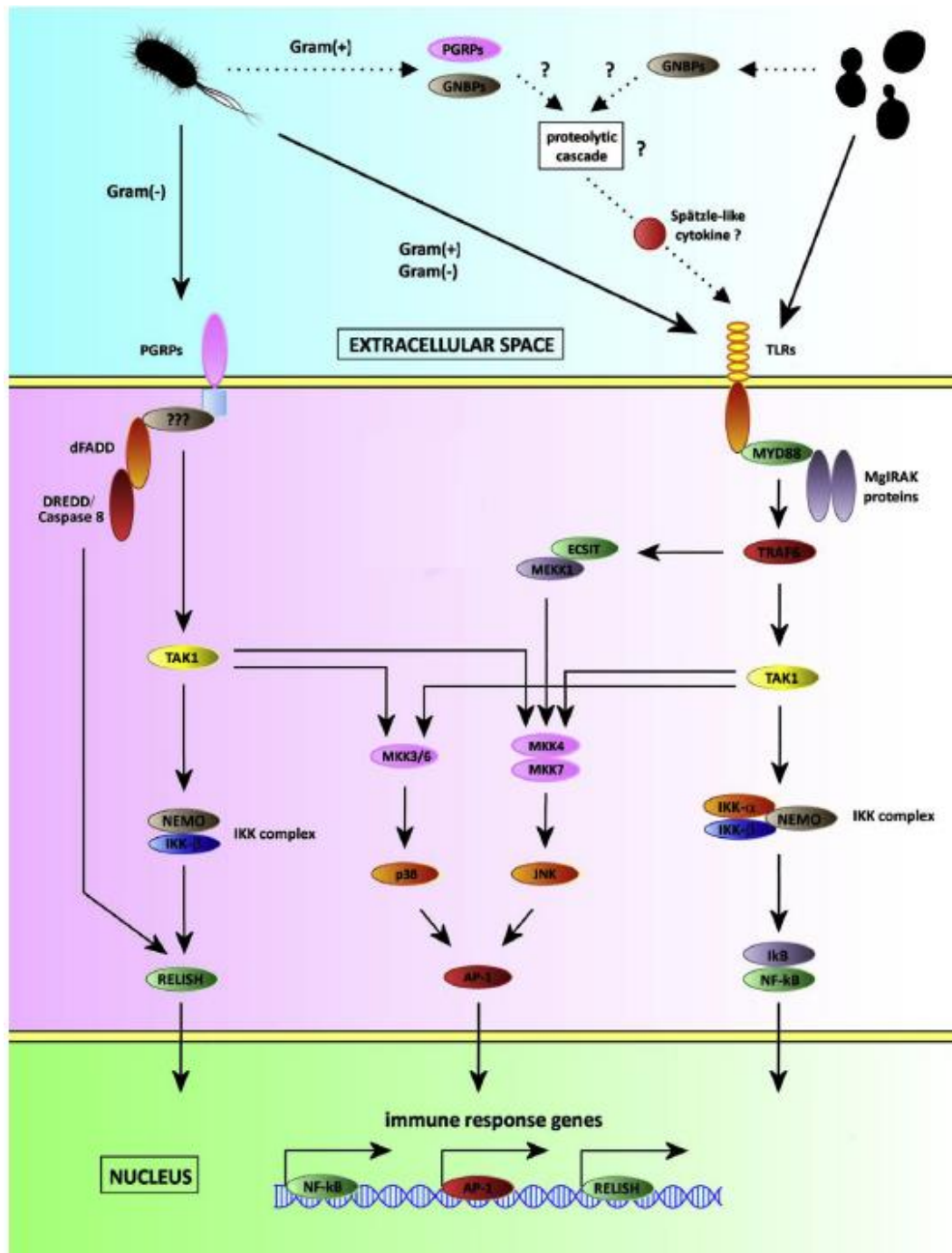


Figure 1.5: Les voies Toll et Imd chez les bivalves. Les PRRs associés aux membranes reconnaissent les PAMs des bactéries, activant la transduction du signal. D'après Gerdol et Venier 2015

### 1.2.3. Les effecteurs de l'immunité

Les effecteurs de l'immunité ne sont pas seulement les peptides antimicrobiens (PAMs). D'autres molécules telles que les lysozymes ou cytokines jouent un rôle important dans la

défense contre les pathogènes et sont directement impliquées dans la mort de ceux-ci. Dans cette partie nous allons recenser, chez les bivalves, ces différents effecteurs.

### a. Les PAMs

Les peptides antimicrobiens sont de façon générale synthétisés suite à la détection d'un « intrus » par les PRRs membranaires. Chez les bivalves, la diversité des peptides antimicrobiens est liée à une diversité de fonctions et de structures. Les defensines et myticines, seront par exemple plus efficaces contre les bactéries Gram + que contre les champignons et bactéries Gram – (Mitta et al., 2000) Six groupes de peptides antimicrobiens ont été identifiés chez les bivalves basés principalement sur leur structure primaire et leur contenu en cystéines (Tableau 1.3). Bien que la majorité des PAMs soit différents chez les Mollusques bivalves et chez les Arthropodes, les défensines possèdent de grandes similitudes dans ces deux phylums (Hubert et al., 1996).

Tableau 1.3: Tableau récapitulatif des différents peptides antimicrobiens chez les bivalves. Adapté de Gerdol et Verdier 2015

PAMs	Espèce	Références
Defensin	<i>M. edulis</i> <i>M. galloprovincialis</i> <i>C. gigas</i> <i>C. virginica</i> <i>D. polymorpha</i>	Charlet et al 1996 Hubert et al 1996 Schmitt et al 2010 Seo et al 2004 Xu et al 2010
Big Defensin	<i>A. irradians</i> <i>C. gigas</i> <i>V. philippinarum</i>	Zhao et al 2007 Rosa et al 2011 Zhao et al 2010
Mytilin	<i>M. galloprovincialis</i> <i>M. edulis</i>	Venier et al 2011 Charlet et al 1996
Myticin	<i>M. galloprovincialis</i>	Mitta et al 1999 Venier et al 2003 Costa et al 2009
Mytimicin	<i>M. edulis</i> <i>M. galloprovincialis</i>	Charlet et al 1996 Shonti et al 2011 Cantet et al 2012
Mytimacin	<i>M. galloprovincialis</i>	Gerdol et al 2012

## b. Autres effecteurs

### -Les lysozymes

Les lysozymes sont des protéines antibactériennes qui clivent la liaison glucosidique  $\beta$  1-4 entre l'acide N-acétylmuramique et l'acide N-acétylglucosamine de la paroi peptidoglycane des bactéries, le plus souvent des Gram  $+$ . Ces protéines sont connues pour être à la fois impliquées dans la digestion et dans l'immunité (Broderick, 2015; Cheng, 1983; McHenery et al., 1979). Différents types de lysozymes existent chez les bivalves: le type C (Chicken type) le type I (Invertebrate type) et le type G (Goose type). Suite à un challenge bactérien, on observe une surexpression des lysozymes de types I et C chez *M. galloprovincialis* (Li et al., 2008; Wang et al., 2013). Certains lysozymes peuvent également présenter une activité amidasique.

### -Les cytokines

Les cytokines sont plus des modulateurs de la réponse immunitaire que des effecteurs à proprement parler. Elles comprennent à la fois les interleukines, les interférons ainsi que les chemokines ou le facteur de transcription TNF (Tumor Necrosis Factor). Les cytokines ont une grande diversité de rôles au sein de l'immunité, affectant des processus variés tels que la prolifération cellulaire, l'inflammation, la phagocytose ou simplement l'amélioration de la réponse immunitaire (Gerdol and Venier, 2015). Peu de cytokines ont été formellement identifiées chez les bivalves. Cependant, suite à une exposition bactérienne chez *C. gigas*, une surexpression de l'interleukine-17-like a été observée dans les hémocytes (Li et al., 2014; Roberts et al., 2008). Enfin, les protéines MIFs (Macrophage Inhibitory Factor) et TNF ont été identifiées respectivement chez *M. galloprovincialis* et chez *Chlamys farreri* (Li et al., 2009; Parisi et al., 2012).

#### 1.2.4. L'apoptose chez les bivalves

L'apoptose est un processus biologique largement impliqué dans le développement mais qui participe également à la réponse immunitaire en empêchant, par la destruction des cellules infectées, l'invasion des pathogènes dans le reste de l'organisme. Ainsi, l'apoptose, appelée aussi Programmed Cell Death type I (PCD I), est de plus en plus étudiée chez les mollusques et bivalves comme un acteur prépondérant de la défense contre les pathogènes (Kiss, 2010; Romero et al., 2015; Sokolova, 2009). La PCD I est divisée en deux voies majeures : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque.

##### a. La voie intrinsèque

La voie intrinsèque, ou voie mitochondriale, est activée par des stimuli ne faisant pas intervenir de récepteur (UV, Reactive oxygen species ROS, polluants environnementaux...), et menant à la production de facteurs pro-apoptotiques dans la mitochondrie puis le cytosol. En bref, suite à l'un de ces stimuli, la membrane externe de la mitochondrie devient perméable, et des facteurs pro-apoptotiques, tels que le Cytochrome c, l'AIF (Apoptosis inducing Factor), ou encore un activateur de caspases, sont libérés dans le cytoplasme. Le cytochrome c se lie à la protéine Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) et en recrutant la pro-caspase 9, forme l'apoptosome qui interagira avec les caspases 3, 6 ou 7 menant à la mort cellulaire (Figure 1.6). Il existe des protéines de régulation de ces

mécanismes intrinsèques. Les plus connues appartiennent à la famille de Bcl-2 et sont, selon les protéines, pro ou anti-apoptotiques. Ces protéines régulatrices de l'apoptose sont elles-mêmes régulées par la protéine p53, qui pourrait agir comme un régulateur et un facteur de transcription (Romero et al., 2015, 2011).

### b. La voie extrinsèque

L'activation de cette voie implique la reconnaissance d'un ligand extérieur par un récepteur transmembranaire de type TNFr (Tumor Necrosis Factor receptor). Cette reconnaissance induit l'activation de protéines adaptatrices de type TRADD, ou FADD, induisant l'activation d'une cascade de caspases qui mène à l'apoptose (Romero et al. 2015).

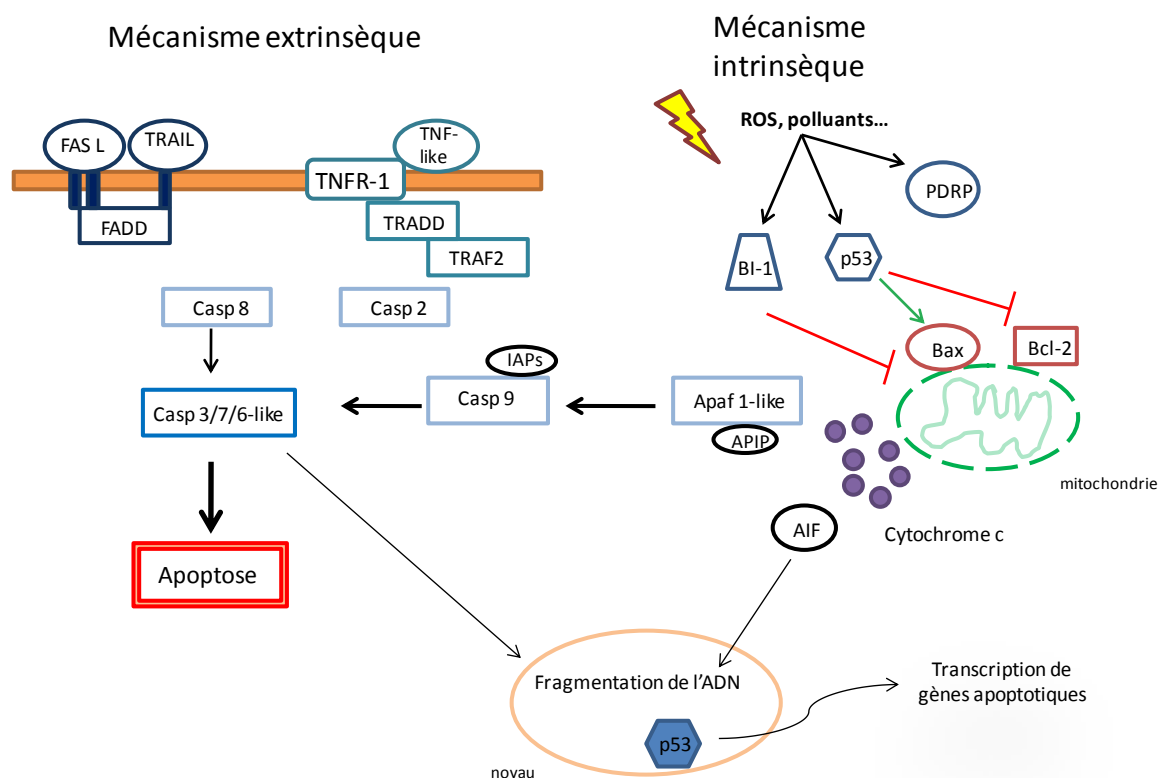


Figure 1.6: Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose chez les bivalves (modèle *M. galloprovincialis*). D'après Romero et al 2015.

ROS: Reactive Oxygen Species, Bi-1: Bax Inhibitor-1; PDRP: p53 and DNA damage-Regulated Protein, Apaf: Apoptotic protease activatig factor; APIP: Apaf interacting protein, Casp: Caspase, IAP: Inhibitor of Apoptosis, AIF: Apoptosis-inducing factor, TRAF: TNF Receptor-Associated Factor, TRADD: Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein, TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor, FADD: Fass Associated Death Domain protein, FAS L: Fas Ligand, TRAIL: tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

Dans cette partie nous avons décrit les grandes lignes de l'immunité chez la drosophile et chez les bivalves. Bien que les processus majeurs soient très similaires, quelques différences sont

notables. Tout d'abord l'existence de la voie Imd et son rôle potentiel, n'ont pas encore été fonctionnellement démontrés à ce jour chez les bivalves. De plus, bien que les défensines possèdent des similitudes, les mécanismes de synthèse de PAMs sont différents. Chez les bivalves, même en absence de bactéries pathogènes, les précurseurs matures ainsi que les peptides sont stockés dans les granules sous forme active et seront engagés dans la réponse immunitaire lors d'infections. Cette réponse a lieu au sein des phagocytes puis les PAMs sont relâchés dans l'hémolymph. Chez les insectes les PAMs ne sont pas stockés, mais sont synthétisés dans le corps gras rapidement après infection, puis relâchés dans l'hémolymph (Hubert et al., 1996; Mitta et al., 2000). Les acteurs moléculaires participant à la réponse immunitaire ont généralement été mis en évidence en relation avec des agents pathogènes. Mais, potentiellement, ils pourraient également jouer un rôle dans les mécanismes de reconnaissance ou de régulation dans le cas d'associations symbiotiques.

## 2. Interactions hôte-symbiotes

Dans cette partie nous nous intéresserons aux interactions hôte/symbiotes et aux mécanismes moléculaires associés. Ceux-ci sont basés sur (i) la reconnaissance du symbiote dans le cas de symbiose à transmission horizontale, (ii) le maintien de ces derniers en formant un microenvironnement sous forme de tissu ou organe symbiotique et enfin (iii) la régulation du nombre de symbiotes afin qu'ils n'envahissent pas d'autres cellules ou tissus et que leur densité ne dépasse pas la capacité d'accueil de l'hôte. Dans un premier temps, nous allons nous intéresser à la partie la plus étudiée, la reconnaissance du partenaire. Une fois l'acquisition des symbiotes effectuée, l'association symbiotique doit être pérenne, nous nous intéresserons donc dans un second temps à la mise en place par l'hôte de mécanismes moléculaires permettant la régulation et le maintien de sa population symbiotique.

### 2.1. Reconnaissance de sa « moitié »

La reconnaissance des partenaires symbiotiques implique un choix, souvent spécifique, pour au moins un des partenaires. Mais qui fait ce choix et comment ? Par exemple, pourquoi la sépiole *Euprymna scolopes* s'associe-t-elle spécifiquement à une espèce de bactérie parmi toutes celles présentes dans la colonne d'eau ?



D'un point de vue écologique, le choix du partenaire est le plus souvent le fait de l'hôte. Celui-ci – de par sa taille - a plus « à perdre » en cas de mauvais choix de partenaire symbiotique. En effet, la reproduction de l'hôte est, en général plus lente que celle des nombreux symbiotes, c'est donc lui qu'une erreur de partenaire impacterait le plus (Douglas 2010). Ainsi, l'établissement et la persistance de la symbiose dépendent dans un premier temps du « bon choix » de partenaire ainsi que de la mise en place de barrières afin de rendre l'association spécifique et d'éviter les tricheurs, comme les nomme Vavre (2009). Ces tricheurs sont des bactéries qui vont profiter des avantages apportés par l'hôte sans lui apporter de bénéfices transformant l'association mutualiste en parasitisme (Vavre, 2009).

Y a-t-il une différence entre acquisition et infection ? Quels sont ces mécanismes de reconnaissance qui permettent un dialogue et une reconnaissance spécifique entre un hôte et son symbiote ?

### 2.1.1. Acquisition ou infection ?

L'acquisition des symbiotes, dans les symbioses à transmission horizontale, est souvent perçue comme un choix de l'hôte, orienté vers une espèce ou souche de bactéries qui lui serait bénéfique. Au contraire l'infection a une consonance plus délétère pour l'hôte, puisqu'il subit la présence de l'envahisseur et n'en tire pas de bénéfices. Cependant, les mécanismes d'établissement de la symbiose et ceux de l'infection par un pathogène sont parfois similaires. Chez le corail *Acropora millepora* qui vit en symbiose avec des dinoflagellés du genre *Symbiodinium*, Kvennefors et collaborateurs (2008) ont identifié un PRR impliqué à la fois dans la fixation de ses symbiotes mais aussi dans la réaction aux pathogènes. Cette protéine appelée millectine est une lectine de type C impliquée notamment dans l'agglutination et la phagocytose des pathogènes. L'hypothèse formulée dans cet article propose un double rôle de cette lectine qui serait exprimée dans le mucus afin d'agglutiner et d'opsoniser les micro-organismes présents dans l'environnement proche pour *in fine* acquérir les protistes symbiotiques ou phagocyter les bactéries pathogènes (Kvennefors et al., 2008). La discrimination entre symbiotes et pathogènes se situerait à un niveau plus en aval, une fois les micro-organismes vacuolisés dans le cytoplasme.

Un autre exemple est celui du phénomène d'apoptose, liée chez *E. scolopes* à la morphogenèse lors de la colonisation par *V. fischeri* ou chez la moule hydrothermale *B. thermophilus* à la réduction de la densité symbiotique (Foster et al., 2000) Guezi et al 2013).

L'apoptose est aussi un phénomène très présent dans le cas de pathologies afin d'éliminer les cellules infectées et les pathogènes qu'elles contiennent (Zychlinsky and Sansonetti, 1997).

Enfin, prenons pour dernier exemple, le complexe multiprotéique TTS III retrouvé chez de nombreuses bactéries pathogènes et leur permettant d'envahir les cellules eucaryotes. Ce complexe a été retrouvé chez les bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium* qui l'utilisent afin d'être internalisées dans les nodules racinaires de légumineuses, leur hôte (Dale et al. 2002).

Ainsi, les mécanismes moléculaires d'infection par un pathogène ou d'acquisition des symbiotes voire de régulation des symbiotes ont de grandes similitudes et font, dans les deux cas, souvent appel aux mêmes acteurs de l'immunité.

### 2.1.2. Exemples de reconnaissance symbiotique en milieux variés

En fonction des habitats, le dialogue hôte-symbiote est plus ou moins facile à mettre en place. Nous prendrons ici deux exemples en milieux variés afin d'avoir une vue d'ensemble des différents mécanismes moléculaires d'interactions.

Comme il a été décrit précédemment (I 3.1.2), les légumineuses ne sont pas capables de fixer l'azote présent dans les sols. Elles vont donc envoyer un signal sous forme de flavonoïdes (métabolites secondaires des plantes) perçu par les bactéries présentes dans leur environnement proche. Les bactéries répondent en synthétisant un lipochito-oligosaccharide, le facteur NOD, qui va se lier à un récepteur à activité serine/thréonine kinase de l'hôte. Ce récepteur possède un ou plusieurs motifs LysM qui se lient au facteur NOD (Schultze & Kondorosi, 1998). Cette liaison induit une dépolarisation de la membrane plasmique induisant une accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. S'ensuit une activation de la voie de transduction du signal menant à un changement de l'expression de certains gènes de la plante (notamment du cytosquelette). Suite à ces modifications, les racines s'enroulent, les nodules se forment et la bactérie entre dans la légumineuse (Radutoiu et al., 2003; Skorpil et al., 2005; Wang et al., 2012a). Cependant l'acquisition de la bactérie chez les légumineuses n'est pas uniquement due à cet échange de signaux, et d'autres mécanismes moins bien renseignés sont suggérés (e.g. reconnaissance *via* les lectines par exemple) (Douglas 2010)

En milieu marin, la symbiose entre une bactérie Gram - *Vibrio fischeri* et la sépiole nocturne *Euprymna scolopes*, constitue un second exemple documenté depuis plus de 20 ans. Cette

association permet à la sépiole d'échapper à ses prédateurs en se camouflant dans la colonne d'eau *via* l'émission de bioluminescence. C'est une symbiose très spécifique car seules certaines souches de *V. fischeri* sont sélectionnées par l'hôte (Ruby et al., 2005). Le recrutement se fait de façon horizontale et à lieu au stade juvénile juste après éclosion. Le processus initial de colonisation est le suivant: tout d'abord les bactéries présentes dans l'environnement entrent en contact avec les cellules épithéliales ciliées du futur organe de luminescence de l'hôte. Chez l'hôte, cette première interaction induit la production de mucus ce qui va entraîner l'agrégation des souches de *V. fischeri* adaptées à la symbiose. Le mucus sert à la fois de chimio-attractant pour les bactéries mais aussi de substrat de croissance pour que la future population bactérienne puisse se développer au sein de l'organe lumineux. Ce processus de signalisation et de reconnaissance est mutuel. En effet, *V. fischeri* possède un gène *sypG* qui code pour un lipopolysaccharide (LPS) facilitant la formation d'agrégats (Hussa et al., 2007) (Figure 1.7). Suite à leur agrégation, les bactéries symbiotiques migrent vers les pores de l'hôte, accèdent à la cavité qui deviendra l'organe de luminescence et se multiplient afin de former une association stable. Les lipopolysaccharides ainsi qu'une cytotoxine, la TCT, produits par les bactéries sont nécessaires à la formation de l'organe lumineux et interdisent l'entrée aux autres bactéries. (Verma and Miyashiro, 2013). La sélection des bactéries symbiotiques se fait donc à la fois *via* le mucus de l'hôte mais aussi par la production bactérienne de MAMPs (Microbes Associated Molecular Pattern).

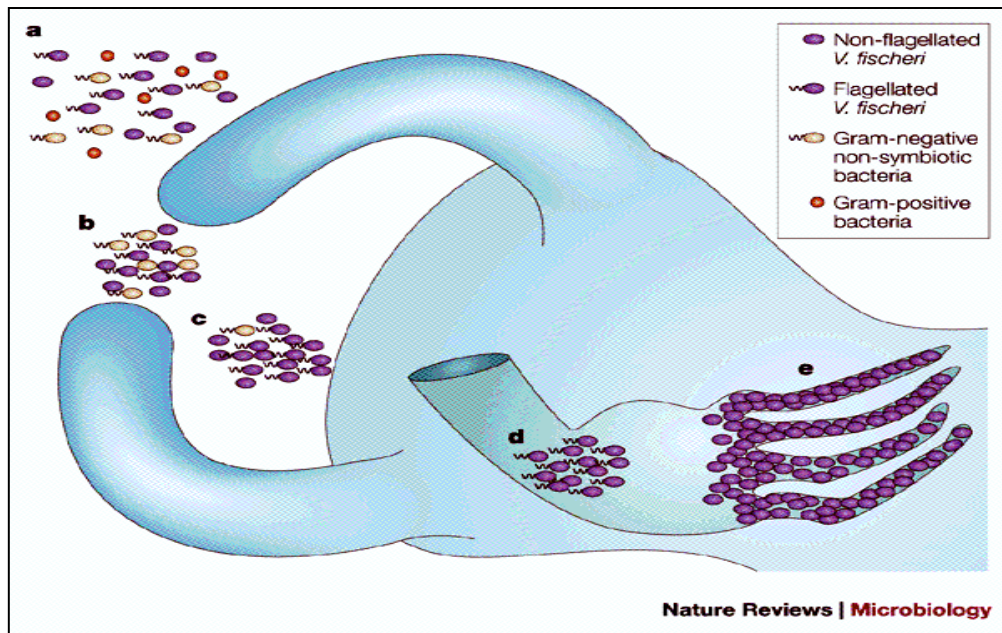


Figure 1.7 : Schéma récapitulatif de la progression de la colonisation de l'organe lumineux par *V. fischeri*. **a.** Les bactéries sont libres, **b.** Agrégation des bactéries dans le mucus, **c.** Seules sont sélectionnés les *V. fischeri* **d.** Entrée des bactéries dans l'antichambre, seules les formes flagellées de *V. fischeri* entrent **e.** Mise en place de la symbiose (Nyholm *et al* 2000.)

Du côté de l'hôte, bien que les mécanismes physiologiques mis en place lors du recrutement des symbiontes soient bien documentés, *i.e.* morphogénèse d'un organe spécifique, les mécanismes moléculaires associés le sont beaucoup moins. Cependant, certaines familles de PRRs ont été identifiées comme étant des acteurs potentiels de la spécificité de cette symbiose. En effet, 5 PGRPs ont été identifiées chez *E. scolopes*, mais seules EsPGRP1 et 2 sont exprimées chez les juvéniles lors de l'acquisition (Collins *et al.*, 2012; Goodson *et al.*, 2005; Troll *et al.*, 2009). EsPGRP1 est une PGRP nucléaire synthétisée dans l'épithélium cilié du futur organe lumineux. Suite au processus de colonisation, le signal bactérien TCT, responsable de la différenciation de l'organe lumineux, inhibe l'expression de EsPGRP1 ce qui initie l'entrée en apoptose des cellules ciliées (Troll *et al.*, 2009). Suite à cela, EsPGRP2, qui possède une activité amidase, est relâchée dans l'organe lumineux afin de neutraliser la toxine TCT et de stopper la morphogénèse (Troll *et al.*, 2010).

## 2.2. Régulation et maintien de la symbiose

Le premier exemple que nous allons prendre est une association symbiotique dans le monde des insectes. Ces dernières sont très largement représentées dans la nature. Les symbiotes ou endosymbiotes apportent à leurs hôtes les acides aminés indispensables à leur croissance,

qu'ils ne sont pas capables de synthétiser eux-même et qui, du fait de leur régime trophique spécifique, sont absents de leur nourriture. Le charançon du maïs *Sitophilus zeamais* vit en association symbiotique avec son endosymbiote primaire (SPE Symbiotic Primary Endosymbiont), une  $\gamma$ -protéobactérie (Heddi et al., 1998). Le SPE est accueilli de façon permanente dans les oocytes à l'intérieur des ovaires, ainsi que dans le *caecum*. Les SPE semblent surtout nécessaires chez le jeune adulte, il a en effet été observé chez les charançons de deux ou trois semaines une diminution drastique du nombre de bactéries symbiotiques (Mansour et al. 1930). De plus, on a découvert, dans le bactériome de ce charançon, la présence d'un unique peptide antimicrobien, la coleopterine A (Anselme et al., 2008) qui serait un inhibiteur de la cytokinèse des SPE. Cet inhibiteur induit corrélativement un gigantisme chez les charançons et une augmentation considérable de la taille des cellules dans lesquelles les bactéries sont hébergées (Login et al., 2011). Ainsi, l'inhibition des mécanismes de division cellulaire serait une façon pour l'hôte de contrôler la densité et l'expansion des SPE, les empêchant de coloniser d'autres tissus (Login and Heddi, 2013).

Un second exemple, en milieu marin cette fois, est celui de l'anémone symbiotique *Aiptasia pulchella* qui vit en symbiose avec une micro algue du genre *Symbiodinium*. L'association cnidaire-microalgue est fréquente chez les Cnidaires et permet l'assimilation par l'hôte de carbone organique *via* la photosynthèse effectuée par le symbiote. Chez *Aiptasia*, les symbiotes sont hébergés dans des cellules digestives du gastroderme, à l'intérieur de vacuoles spécialisées appelé symbiosome (Trench 1979; Schwarz et al. 2002). Le symbiosome est un phagosome altéré dans sa maturation, ce qui empêche dans un premier temps sa fusion avec des lysosomes, et permet dans un second temps, la destruction des symbiotes par phagocytose (Desjardins et al., 1997). Chen et co-auteurs (2005) se sont intéressés à l'homologue de Rab11 chez *Aiptasia* (ApRab11), protéine impliquée dans la maturation des phagosomes (Cox et al. 2000). Ils se sont intéressés à la présence de cette protéine dans le symbiosome et ont observé une exclusion de celle-ci dans les symbiosomes contenant un *Symbiodinium* sain, et un recrutement de cette même protéine dans les symbiosomes contenant un symbiote mort. Ainsi, ApRab11 pourrait être un acteur central du maintien ou de la régulation des symbiotes chez *Aiptasia pulchella* (Chen et al., 2005).

Enfin, dans l'association légumineuse-*Rhizobium*, d'autres mécanismes sont mis en jeu. Les espèces actives de l'oxygène (ROS) seraient par exemple des acteurs importants de la nodulation (Hérouart et al., 2002).

Issus de milieux différents, ces exemples mettent en évidence l'implication de la machinerie cellulaire et notamment du système immunitaire de l'hôte dans la régulation des symbiotes afin de maintenir l'équilibre de la symbiose. Cependant les interactions hôte-symbiotes ne sont pas limitées à la régulation et à l'établissement de cette dernière. Une fois établies ces associations permettent l'échange de nutriments entre hôtes et symbiotes.

### 2.3. Transfert de nutriments

La symbiose permet l'acquisition de nouvelles compétences métaboliques ou du moins l'accès à des nutriments supplémentaires voire nécessaires à la croissance d'un ou des protagonistes de cette association. Dans les symbioses photosynthétiques, par exemple, l'hôte a accès au carbone organique synthétisé par le symbiote. Mais les échanges doivent être bilatéraux afin que les bénéfices soient mutuels.

#### 2.3.1. Transfert du symbiote vers l'hôte

De nombreux exemples de transfert de nutriments ont été développés précédemment dans cette introduction (I.3.1). Trois grands modes sont recensés dans l'acquisition de nutriments. Le plus fréquent est la biotrophie qui consiste en l'échange de molécules entre partenaires, ce qui est le cas dans l'association légumineuse-*Rhizobium*, chez les insectes tels que le charançon ou le puceron du pois, dont les symbiotes apportent des acides aminés non-présents dans la sève, ou encore dans les associations photosynthétiques telles que chez les cnidaires-dinoflagellés (Douglas, 1994). Le second est la sapotrophie, qui représente l'acquisition par l'hôte des déchets produits par le symbiote. C'est le cas dans le tube digestif humain, où l'homme digère le produit de la dégradation d'aliments réalisée par des bactéries. Enfin, la nécrotrophie ou autophagie désigne l'acquisition par l'hôte de nutriments *via* la digestion du symbiote. Ainsi, l'expression des lysozymes chez le vestimentifère *Riftia pachyptila*, et chez la moule hydrothermale *Bathymodiolus thermophilus* suggèrent une acquisition des nutriments par autophagie chez ces deux espèces (Boetius and Felbeck, 1995; Bright et al., 2000).

#### 2.3.2. Transfert de l'hôte vers le symbiote

Une des grandes caractéristiques des symbioses est la création par l'hôte d'un micro-environnement adéquat à la croissance et à la division de ses symbiotes. Cela passe par l'apport de nutriments essentiels à ces derniers. Chez la majorité des bivalves symbiotiques des sources hydrothermales cet apport est effectué de façon passive par l'hôte. En effet, les nutriments sont apportés aux symbiotes *via* filtration de l'eau de mer à travers les branchies, apportant oxygène et composés réduits ( $H_2S$ ,  $H_2$ ,  $CH_4$ ) assimilables par la bactérie (Cavanaugh et al., 1992). Le clam *Calyptogena magnifica* lui utilise son pied extensible pour capter le sulfure d'hydrogène au fond des crevasses, le fixer sur une protéine circulante et le transporter *via* l'hémolymphe jusqu'aux branchies, lieu de vie des symbiotes (Zal et al. 2000). Le ver marin *Olavius algarvensis* produit, lorsqu'il se trouve dans des sédiments profonds anoxiques, de grandes quantités de déchets issus de son métabolisme anaérobie, la fermentation (acétate, propionate, malate et succinate). Ces déchets ne seront pas éliminés par l'hôte qui ne possède pas de système d'excrétion mais seront utilisés comme substrat par ses symbiotes (Kleiner et al., 2012a). Ces trois exemples en milieu réduit attestent de la bilatéralité des échanges hôte-symbiotes.

Ces transferts de nutriments entre hôte et symbiotes peuvent avoir des conséquences sur les voies métaboliques de l'hôte et / ou du symbiote. En effet, Colebatch et collaborateurs (2004) ont montré une surexpression d'une vingtaine de gènes impliqués dans le métabolisme des sucres dans les nodules (tissus symbiotique) de *Lotus japonicus* en comparaison de leur expression dans le reste de l'organisme. De même, une surexpression des gènes impliqués dans le métabolisme redox a été observée (Colebatch et al., 2004). De plus, au sein des symbioses à transmission verticale, telle que dans l'association *Buchnera*/puceron, un partage de voies métaboliques entre hôte et symbiotes a été démontré (Russell et al., 2013).

Dans cette première partie, nous nous sommes attachés à présenter les différents aspects de la symbiose ainsi que les mécanismes moléculaires mis en jeu et connus à ce jour. Ceci nous a amené à nous intéresser aux mécanismes de l'immunité. Après une description succincte de l'immunité générale des invertébrés, nous nous sommes intéressés à celle des bivalves dont fait partie *Bathymodiolus azoricus*, notre organisme d'étude. Cette description du répertoire immunitaire des bivalves, va nous permettre de mieux comprendre les réponses de *B. azoricus* à ces changements de densité symbiotique. Dans la suite de cette introduction, nous

préciserons les objectifs des travaux de cette thèse, puis nous présenterons l'organisme d'étude, son environnement, et sa biologie.



### III. Objectifs de thèse

Les travaux entrepris au sein de cette thèse s'intègrent dans le cadre de l'étude des relations hôte-symbiotes chez un modèle inféodé aux écosystèmes dit extrêmes que sont les sources hydrothermales. La compréhension des relations hôte-symbiotes passe par la connaissance des mécanismes moléculaires qui régissent la communication entre les protagonistes de cette interaction. Pour identifier ces mécanismes, nous avons mené, dans un premier temps, une étude globale et exploratoire, à la fois au niveau du transcriptome et du protéome d'individus symbiotiques et d'individus ayant perdu une partie plus ou moins importante de leur charge symbiotique. Cette première partie constitue un « repérage » des gènes et protéines pouvant être impliqués dans les interactions hôte-symbiotes que nous avons décrites précédemment telles que, la reconnaissance, le maintien et la régulation des symbiotes, mais aussi le transfert de nutriments. Dans cette thèse, nous avons pris le parti de nous focaliser sur les acteurs moléculaires associés à l'hôte.

Dans un second temps, et à partir des données collectées précédemment, nous avons mené une approche ciblée sur des protéines différentiellement exprimées en fonction de la charge symbiotique des individus. Parmi ces dernières, nous nous sommes focalisés d'une part sur deux familles de gènes impliqués dans des processus immunitaires, les lysozymes et les PGRPs, et d'autre part sur différents gènes impliqués dans le processus apoptotique.

Le choix du modèle d'étude *Bathymodiolus azoricus* (décrit dans la partie IV), repose sur la grande plasticité phénotypique de cette symbiose à transmission horizontale impliquant deux symbiotes bactériens (méthanotrophe et sulfoxydant) et modulable en fonction des conditions du milieu (Boutet et al., 2011).

## IV. Modèle d'étude: *Bathymodiolus azoricus*

Dans cette partie nous allons décrire notre modèle d'étude, *Bathymodiolus azoricus*. Afin de bien comprendre le mode de vie de cet organisme, nous allons, dans un premier temps, décrire son milieu de vie, les sources hydrothermales, leur formation, leur distribution et leurs caractéristiques physico-chimiques. Dans un second temps, nous nous intéresserons brièvement à la faune symbiotique ayant colonisé les abords des sources hydrothermales de par le monde, et enfin nous décrirons l'écosystème et la biologie de *B. azoricus*, et justifierons le choix de ce dernier comme organisme d'étude.

### 1. Les sources hydrothermales, un environnement instable

Dans les mers et océans, à partir de 200 m de profondeur, l'obscurité est totale et la photosynthèse impossible. Cette absence de lumière a longtemps étayé l'idée qu'il n'y avait pas de vie dans ces zones obscures. Cependant, l'expédition océanographique britannique du *Challenger* (1872–1876) observa la présence de vie dans les grandes profondeurs océaniques (jusqu'à 5200m) avec certes une grande biodiversité spécifique mais aussi une très faible abondance : le paradigme du désert abyssal était né (Hessler and Sanders, 1967). Mais en 1977, près des îles Galapagos, lors d'une expédition américaine destinée à étudier la géologie des sources hydrothermales, la surprenante abondance de la faune qui leur est associée a été révélée, bouleversant ce paradigme (Corliss et al., 1979).

Les sources hydrothermales profondes se forment le plus souvent au niveau des dorsales océaniques, ces zones frontières où deux plaques tectoniques divergent et où s'observe une expansion de la lithosphère ainsi qu'au niveau de zones de subduction (bassins arrière-arcs). Celles-ci sont présentes dans le monde entier, dans tous les océans : Pacifique, Atlantique, Indien, Arctique ou Antarctique (Figure 1.8). Ce sont donc des zones de fortes activités volcanique et tectonique, ce qui a pour conséquence la fragilisation de la croûte océanique et la formation de fissures. L'eau de mer s'infiltre en profondeur dans ces fissures et se réchauffe au contact de la roche basaltique en fusion, puis remonte en surface et rejaillit au niveau des sources où la température peut être très élevée (Figure 1.9). Le fluide hydrothermal qui remonte en surface s'est alors enrichi en composés réduits tels que  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_4$  ou  $\text{H}_2$  ainsi qu'en éléments métalliques tels que  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ . Le mélange de ce

fluide à haute température (entre 250 et 450°C) avec l'eau de mer froide (2-5°C) provoque la précipitation de divers sulfures métalliques et de sulfate de calcium anhydre, entraînant la constitution progressive des cheminées hydrothermales (Zierenberg et al., 2000) (Figure 1.10).

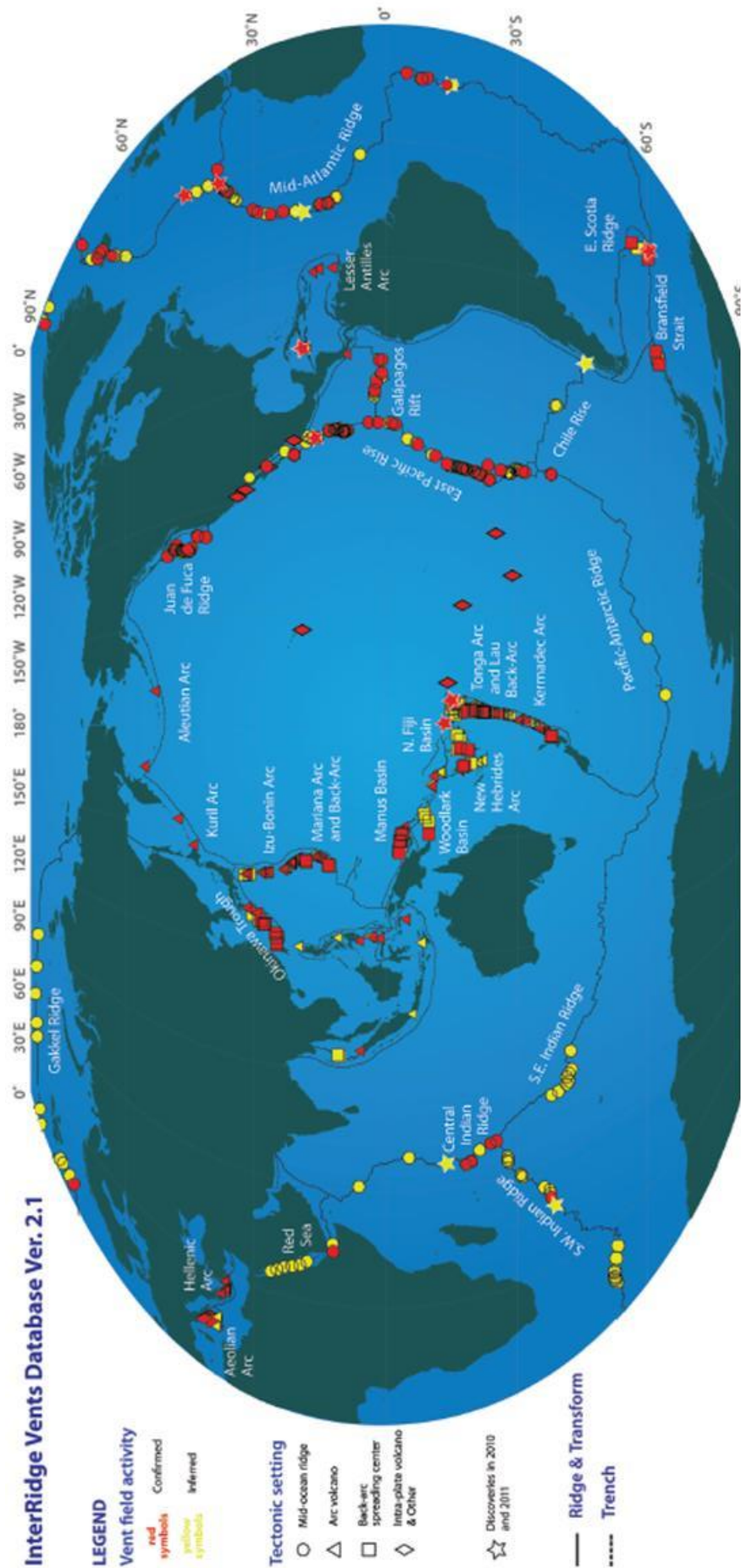


Figure 1.8: Carte de la distribution mondiale des sources hydrothermales. <http://vents-data.interridge.org>. Version 2.1 (2011)

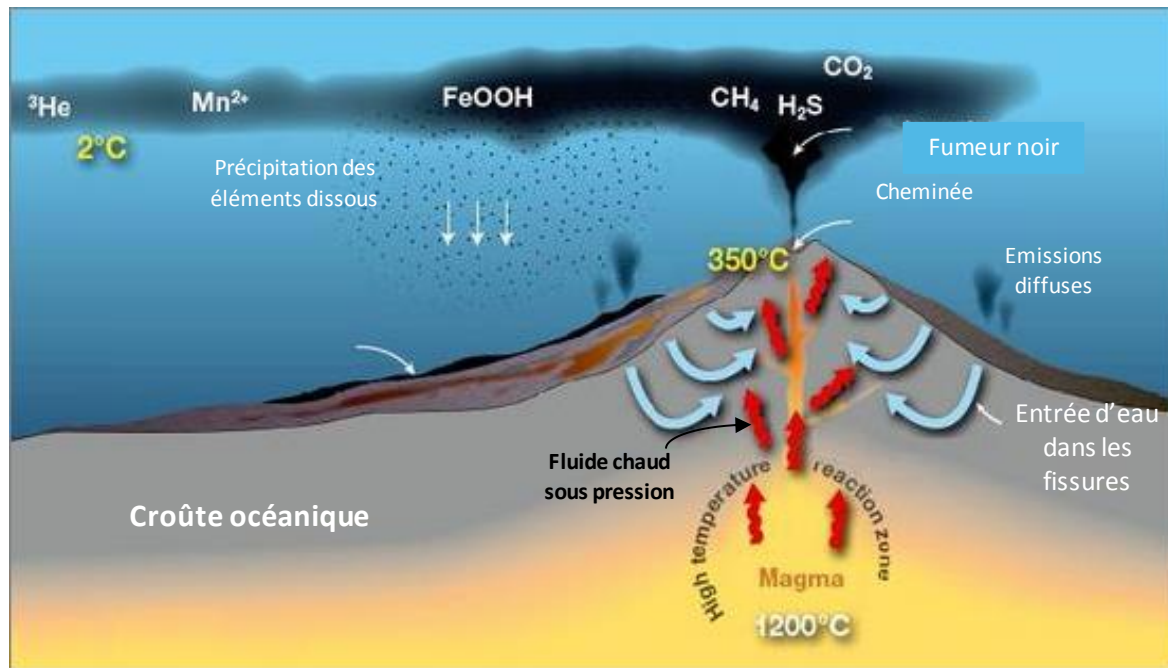


Figure 1.9 : Formation du fluide hydrothermal par entrée d'eau de mer froide dans les microfissures de la croûte. Modifié d'après Gns.cri.nz, Institute of Geological and Nuclear Sciences

Autour de celles-ci, l'eau de mer s'acidifie (pH entre 1,5 et 5), un gradient chimique des différents composés dissous se met en place, et la vie hydrothermale se développe (Cavanaugh et al., 2006). Malgré l'absence de lumière, l'hétérogénéité et la toxicité du milieu d'importantes communautés vivantes se sont en effet développées autour des sources. En premier lieu, d'importantes communautés microbiennes s'y développent, notamment des Archaea et Bacteria thermophiles et extremophiles, mais également des communautés de micro-organismes autotrophes, utilisant les composés réduits du fluide hydrothermal pour réaliser une production primaire locale (Orcutt et al., 2011; Takai et al., 2006). Celle-ci est à son tour exploitée par des organismes hétérotrophes, procaryotes ou eucaryotes, dont une grande quantité d'animaux immédiatement visibles sur les images sous-marines. La biomasse animale au sein de ces écosystèmes, bien qu'abondante, est peu diversifiée en comparaison de celle des plaines abyssales alentours. Les différentes espèces animales se répartissent autour des cheminées en fonction de leur tolérance physiologique au fluide hydrothermal et aux composés toxiques qu'il contient. Ainsi, sur les sites des Açores, les crevettes *Rimicaris exoculata* sont proches des points d'émission de fluide alors que les moules *Bathymodiolus azoricus* sont un peu plus en retrait (à une température aux alentours de 10°C) (Desbruyères et al. 2001).

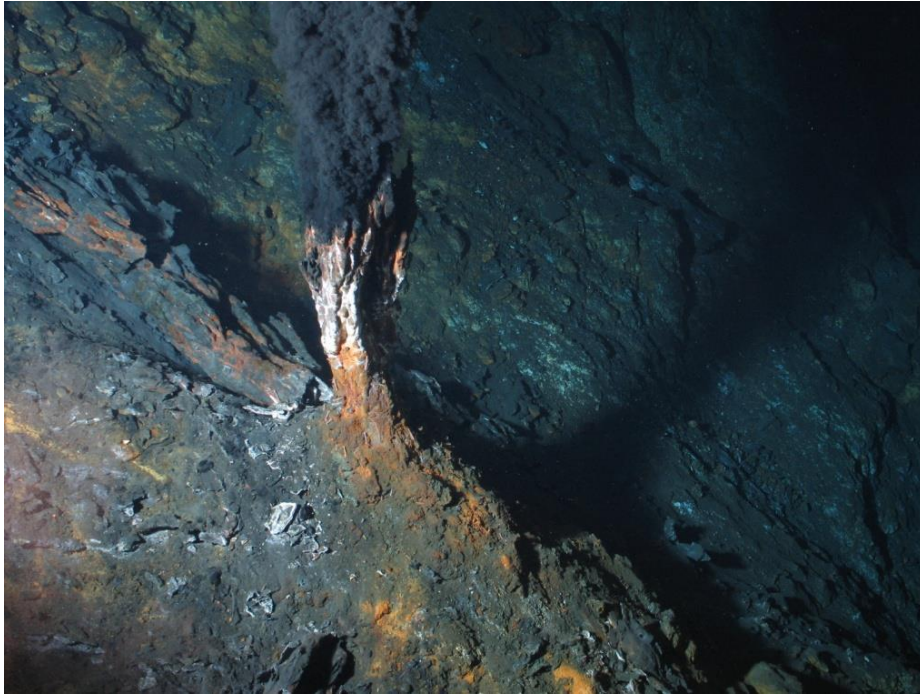


Figure 1.10 : Exemple de fumeur noir actif au niveau de la dorsale medio-Atlantique, Rainbow (-2500m) durant la mission BioBaz 2013 plongée 519  
©Ifremer

Dans cet environnement hétérogène, les espèces les plus abondantes de la faune vivent en association symbiotique avec des bactéries chimioautotrophes, dont le métabolisme met à profit l'oxydation des composés réduits présents dans l'environnement.

## 2. Diversité des symbioses associées aux sources

### 2.1. Diversité des hôtes animaux

Trois groupes taxonomiques d'invertébrés marins représentent la majorité de la biomasse des sources hydrothermales, les annélides, les arthropodes et les mollusques (Tunnicliffe 1991; Van Dover & Fry 2004) (Figure 1.11). Au sein de ces groupes taxonomiquement différents, certaines espèces, abondantes aux abords des cheminées, vivent en symbiose avec des bactéries chimioautotrophes. Ces symbioses sont le résultat d'une convergence évolutive et revêtent des caractéristiques contrastées : obligatoires ou non, ecto- ou endosymbioses, à transmission verticale ou horizontale.

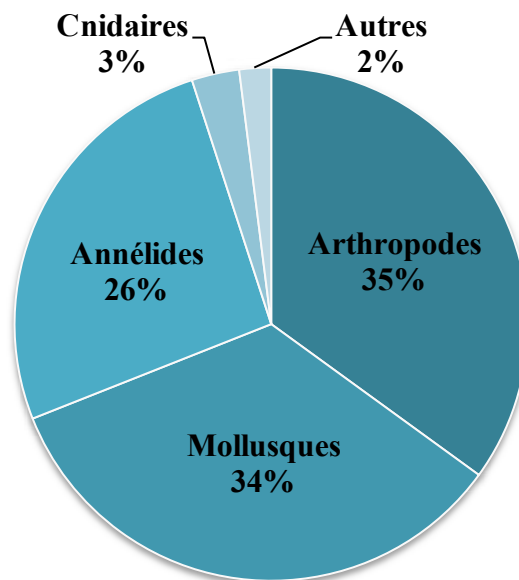


Figure 1.11 : Composition en abondance de la faune associée aux sources hydrothermales.  
(adapté à partir de Tunnicliffe et al 1998)

#### 2.1.1. Les arthropodes symbiotiques

De nombreux arthropodes décapodes sont observés proche des sources hydrothermales. Certains sont nécrophage tels que le crabe *Segonzacia mesatlantica* (Segonzac 1992) qui vit au niveau de la dorsale médio-atlantique tandis que d'autres, crevettes, galathées ou ciripèdes, se nourrissent au moins en partie *via* leur symbiotes. Prenons l'exemple de la crevette *Rimicaris exoculata* qui domine largement la biomasse des sites TAG, Snake-Pit et Rainbow



de la dorsale médio-Atlantique (Segonzac et al 1994) (Figure 1.12). Celles-ci sont très mobiles, elles gravitent autour des cheminées « en essaims » et vivent en symbiose avec des bactéries phylogénétiquement différentes et capable d'oxyder sulfures et méthane. Les bactéries sont hébergées dans la cavité céphalothoracique de *Rimicaris* lui apportant carbone et source d'énergie, malgré la présence chez cette crevette d'un tube digestif encore fonctionnel (Ponsard et al., 2013; Zbinden and Cambon-Bonavita, 2003). Plus récemment, une crevette, *Rimicaris kairei*, phylogénétiquement proche de *R. exoculata* a été identifiée au niveau de la dorsale centro-Indienne. Celles-ci possèdent quelques différences morphologiques mais s'associent de la même façon avec ses bactéries symbiotiques (Watabe & Hashimoto 2001).



Figure 1.12 : Essaim de *Rimicaris exoculata* , sources hydrothermales de la dorsale médio-Atlantique, site Rainbow (-2500m) durant la mission BioBaz 2013 plongée 519 ©Ifremer

### 2.1.2. Les annélides symbiotiques

Les annélides symbiotiques associés aux sources hydrothermales sont pour la majeure partie des polychètes (Bright and Giere 2005) se répartissant dans deux familles : les Siboglinidae et les Alvinellidae. Parmi les Siboglinidae, les vestimentifères se caractérisent par une absence de tube digestif chez l'adulte. Ce sont notamment le « ver géant » *Riftia pachyptyla*, emblématique des sources hydrothermales du Pacifique est (Figure 1.13), le « ver de Jericho »



(*Tevnia jerichonana*) ou *Ridgeia piscesae*. Ces espèces sont toutes très proches phylogénétiquement (Hilário et al. 2011; Urcuyo et al. 2003; McMullin et al 2003). Elles vivent aux abords des sources hydrothermales de la dorsale est-Pacifique en association endosymbiotique avec des  $\gamma$ -proteobactéries sulfo-oxydantes, mais d'autres espèces de Siboglinidae colonisent les zones de suintement froid. Chez *Riftia*, comme cela a pu être mentionné précédemment, la transmission des symbiotes se fait horizontalement à partir de l'environnement, au stade larvaire, lors du recrutement benthique.

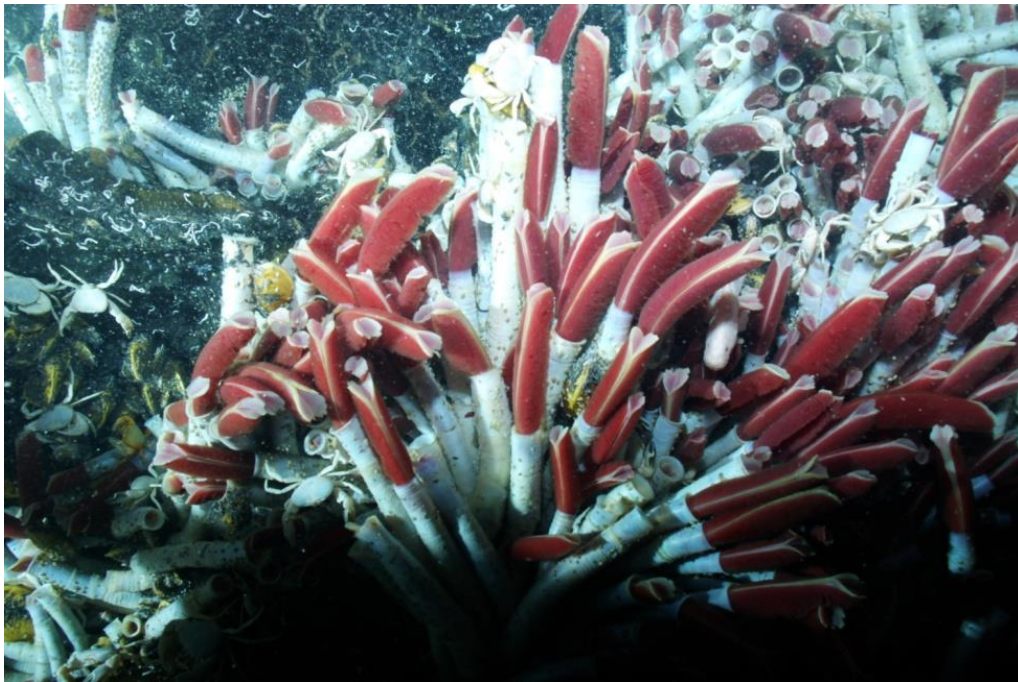


Figure 1.13 : Le ver géant *Riftia pachyptila*, sources hydrothermales de la ride est-Pacifique (-2508m) site Bio9 durant la mission Mescal 2 plongée 1819-08-08  
©Ifremer

Une autre famille endémique des sources, les Alvinellidés, appartenant au groupe des Terebellida, s'associent avec des bactéries qui vivent en ectosymbiose sur des expansions cuticulaires de leur hôte (Desbruyères et al., 1998). Le ver de Pompeii (*Alvinella pompejana*) constitue l'espèce emblématique de cette famille (Figure 1.14) et son épibiose est constituée de bactéries filamenteuses ( $\xi$ - proteobacteries). Les recherches sur les espèces de ce groupe se sont néanmoins concentrées sur leur caractère thermophile et le rôle de leur épibiose bactérienne reste encore largement méconnu, bien qu'elle puisse potentiellement être impliquée dans la nutrition de l'hôte et/ou la détoxification du milieu.

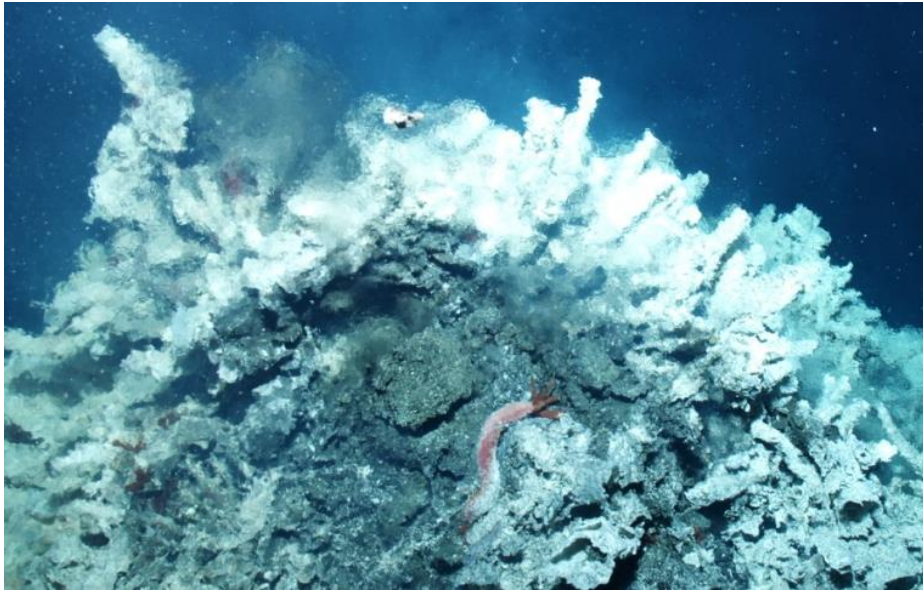


Figure 1.14 : Le ver de pompeii *Alvinella pompejana*, sources hydrothermales de la ride est-Pacifique, (-2508m) site Bio9 durant la mission Mescal 2 plongée 1821-10-10 ©Ifremer

### 2.1.3. Les mollusques symbiotiques

Les mollusques symbiotiques représentent le *phylum* le plus abondant au niveau des sources hydrothermales (Tunnicliffe et al 1998). Parmi-ceux-ci, on trouve des gastéropodes Provannidés, comme *Alviniconcha hessleri* et *Ifremeria nautilei* du Pacifique oriental et de l'océan Indien, qui vivent en endosymbiose avec des  $\gamma$ - et des  $\xi$ -protéobactéries sulfoxydantes localisées dans des cellules branchiales spécialisées (Suzuki et al., 2006) et parfois même des  $\alpha$ -protéobactéries méthanotrophes (Borowski et al 2002). Mais c'est surtout parmi les bivalves qu'est dénombrée la plus grande diversité d'espèces symbiotiques. Ces derniers appartiennent à cinq familles réparties dans trois sous-classes largement divergentes du point de vue phylogénétique: les Solemyidae (Protobranchia), les Mytilidae (Pteriomorphia), et trois familles d'Heterodonta, les Lucinidae, les Thyasiridae et les Vesicomysidae.

La famille des Solemyidae se distingue des autres familles de bivalves car les associations symbiotiques y sont plus anciennes au niveau phylogénétique (Krueger et al 1996). Il en existe environ 25 espèces réparties dans les sédiments des grands fonds dans le monde entier et ayant subi de nombreuses adaptations à la vie symbiotique (hypertrophie des branchies, réduction du tube digestif...). Prenons l'exemple d'*Acharax alinae* qui vit ensevelie dans les

sédiments du bassin de Lau (Metivier & Von Cosel 1993). Ce bivalve accueille dans ses branchies (appelées encore cténidies chez de nombreux mollusques dont les bivalves) des endosymbiotes de type  $\gamma$ -protéobactéries sulfo-oxydantes. Neulinger et collaborateurs ont suggéré en 2006 que ces endosymbiotes, bien que phylogénétiquement proches de ceux de *Solemya* (groupe frère d'*Acharax*), étaient néanmoins différents (Neulinger et al., 2006). Ainsi, au sein de la famille Solemyidae, les différentes espèces d'hôtes bien que très proches et partageant des propriétés morphologiques communes, auraient établi leurs associations symbiotiques de façon indépendante.

Parmi les bivalves présents au niveau des sources hydrothermales, la famille des Thyasiridae est celle qui possède la plus grande variabilité anatomique du fait que seule une partie de ses membres est symbiotique. Lorsque les Thyasiridae vivent en symbiose, celle-ci est le plus souvent extracellulaire (Dufour, 2005). *Thyasira southwardae* par exemple, vit dans les sédiments aux abords du site Logatchev (-3080m) sur la dorsale médio-Atlantique et possède des bactéries sulfo-oxydantes en épibiose entre les *microvilli* des cellules branchiales (Oliver and Holmes, 2006). Cependant, chez *Maorithyas hadalis*, les symbiotes observés dans les branchies sont intracellulaires (Fujiwara et al., 2001).

La famille des Lucinidae est sans doute la plus diversifiée des mollusques chimiosynthétiques. Ils vivent en endosymbiose obligatoire avec des bactéries sulfo-oxydantes et ont colonisé la majorité des habitats chimiosynthétiques de la planète, en particulier les sédiments anoxiques. Les Lucinidae accueillent leurs bactéries symbiotiques dans des bactériocytes présents dans la zone latérale des filaments branchiaux (Taylor and Glover, 2006).

La famille des Vesicomidae contient plus de 100 espèces différentes ayant colonisé les sédiments profonds, les suintements froids et les sources hydrothermales (von Cosel and Olu, 2009). L'espèce emblématique de cette famille, de par sa grande taille (jusqu'à 28 cm) est *Calymene magnifica* (Figure 1.15). Elle vit en périphérie des sources, le pied enfoui dans les fissures du basalte, et en association endosymbiotique avec des bactéries sulfoxydantes logées dans ses branchies. *C. magnifica* ayant un tube digestif quasi-vestigial, le métabolisme chimiosynthétique des endosymbiotes constitue l'apport quasi-exclusif de matière organique pour cette espèce (Cavanaugh, 1983). De plus, la transmission des symbiotes est verticale, leur présence dans les ovocytes étant avérée (Cary and Giovannoni, 1993).



Figure 1.15 : *Calyptogenia magnifica* sud-est de la ride Pacifique , campagne Biospeedo 2004  
©Ifremer

Enfin, la famille des Mytilidae, surtout connue pour ses espèces côtières d'intérêt économique *Mytilus edulis* et *M. galloprovincialis*, espèces hétérotrophes ayant un régime typique de filtreurs suspensivores, comporte également des espèces symbiotiques réunies pour la plupart dans la sous-famille des Bathymodiolinae (voir ci-dessous).

## 2.2. Diversité des symbiotes bactériens

Si la diversité des animaux capables d'établir une symbiose chimiosynthétique est immédiatement visible et traduit une convergence adaptative avec des histoires évolutives diverses (Little and Vrijenhoek, 2003), il est intéressant et important d'adopter le point de vue symétrique de l'histoire évolutive et de la diversité des bactéries qui forment ces symbioses.

La révolution technologique du séquençage d'ADN a permis assez récemment d'avoir accès aux séquences d'ARN 16S des symbiotes associés aux invertébrés des environnements chimiosynthétiques quand bien même ceux-ci ne peuvent être cultivés. Ainsi, il a été découvert que la majorité des symbiotes chimioautotrophes associés aux sources hydrothermales sont des  $\gamma$ -, des  $\varepsilon$ - ou des  $\alpha$ -protéobactéries. Les bactéries sulfo-oxydantes sont majoritairement des  $\gamma$ -protéobactéries et vivent en symbiose avec une grande partie des invertébrés associés aux écosystèmes chimiosynthétiques (Nakagawa and Takai, 2008)(Bright and Giere 2005). Mais les analyses phylogénétiques montrent qu'il existe au sein de ces  $\gamma$ -



protéobactéries sulfoxydantes, au moins 9 clades phylogénétiquement distincts, séparés par des clades de bactéries libres, suggérant une évolution indépendante des symbioses sulfo-oxydantes (Dubilier et al., 2008). Les  $\epsilon$ -protéobactéries bien que moins fréquentes dans les associations symbiotiques, ont cependant été retrouvées en endosymbiose chez le gastéropode *Alviniconcha hessleri* (Suzuki et al., 2006), associées à des  $\gamma$ -protéobactéries ou en ectosymbiose chez l'annélide *Alvinella pompejana* ou la crevette *Rimicaris exoculata* (Cary et al., 1998; Chevaldonné et al., 1997).

Parmi ces bactéries symbiotiques associées aux sources hydrothermales certaines sont chimiolithotrophes comme les sulfo-oxydantes - elles utilisent des composés inorganiques comme source d'énergie ( $H_2S$ ,  $H_2$ ) - et d'autres sont chimioorganotrophes - utilisant des molécules organiques ( $CH_4$ , souvent d'origine organique). Les symbiotes sulfo-oxydants oxydent des composés chimiques réduits tels que le sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ), le thiosulfate ( $S_2O_3^{2-}$ ), le soufre élémentaire ( $S^0$ ) ou encore le dihydrogène ( $H_2$ ), les transformant en source d'énergie (Friedrich et al., 2001; Petersen et al., 2011). La source de carbone vient du  $CO_2$  dissous dans l'eau qui sera fixé par l'intermédiaire du cycle de Calvin-Benson ou au cours du cycle de Krebs inversé (rTCA cycle: reverse Tri-Carboxylic Acid cycle) (Kleiner et al., 2012a). Les symbiotes méthanotrophes utilisent le méthane à la fois comme source d'énergie et de carbone. La première étape de l'oxydation du méthane en  $CO_2$  est la conversion en méthanol grâce à l'enzyme méthane monooxygénase (MOO) menant ensuite à la formation du formaldéhyde qui sera intégré selon le type de bactéries méthanotrophes, dans la voie des sérines ou dans la voie RuMP (Hanson and Hanson, 1996).

### **3. Les Bathymodiolinae et *Bathymodiolus azoricus*, notre organisme d'étude**

#### **3.1. Contexte taxonomique, biogéographique et symbiotique**

Les moules du genre *Bathymodiolus* sont des mollusques bivalves de la famille des mytilidés découvertes initialement aux abords des sources hydrothermales (Kenk & Wilson 1985) et suintements froids (Gustafson et al., 1998). Depuis, d'autres espèces apparentées ont été décrites certaines associées aux dépôts organiques tels que les os de baleine et les bois coulés (Distel et al., 2000; Lorion et al., 2010, 2013). A ce jour, une cinquantaine d'espèces de bathymodiales a été recensée dans l'ensemble des écosystèmes chimiosynthétiques,

aujourd'hui réparties dans une dizaine de genres (Figure 1.16) (Thubaut et al., 2013). Pour l'ancien genre « *Bathymodiolus* » (sensu lato), 14 espèces vivent au niveau de la ride Pacifique, 7 dans l'océan Atlantique et 1 dans l'océan Indien (Kyuno et al., 2009; Miyazaki et al., 2010) illustrant la vaste répartition géographique des Bathymodiolinae. Toutes ces espèces vivent en symbiose avec un ou plusieurs types de  $\gamma$ -protéobactéries chimioautotrophes. La localisation, le type ainsi que le nombre de symbiotes diffèrent en fonction des espèces (Duperron et al., 2009), cependant la majorité des bathymodioles est associée avec des bactéries sulfo-oxydantes vivant en endosymbiose au sein des bactériocytes de la branchie. C'est le cas par exemple de *Bathymodiolus thermophilus* qui fut la première espèce collectée au niveau de la ride des Galapagos en 1977 (Kenk and Wilson 1985) et qui a aussi colonisé les abords de la ride est-Pacifique. D'autres, tels que *B. childressi*, qui vit dans les environnements de fluides froids (Barry et al., 2002; Childress et al., 1986; Eckelbarger and Young, 1999; Fujiwara et al., 2000) vivent avec des endosymbiotes méthanotrophes. Ces derniers oxydent le méthane présent dans l'environnement afin de former une source d'énergie et de carbone pour son hôte. Enfin, certaines espèces vivent en « ménage à trois », à savoir qu'elles accueillent dans leurs branchies deux types de symbiotes, des bactéries sulfo-oxydantes et des bactéries méthanotrophes. C'est le cas de *B. brooksi*, *B. puteoserpentis*, *B. aff. boomerang* et *B. azoricus* (Distel et al., 1995; Duperron et al., 2006; Fiala-Médioni et al., 2002; Fisher et al., 1993; Robinson et al., 1998). Cette dernière espèce constitue notre organisme d'étude.

## 3.2. *Bathymodiolus azoricus*

### 3.2.1. Milieu de vie de *B. azoricus*

*Bathymodiolus azoricus* est inféodée aux sources hydrothermales de la dorsale médio-Atlantique (MAR) (Von Cosel et al 1999). Cette espèce est présente en abondance sur trois sites principaux au nord de la jonction triple des Açores : Menez Gwen (-800m), Lucky Strike (-1700m) et Rainbow (-2500m) et a été retrouvée un peu plus au sud de façon plus éparse en co-habitation avec *B. puteoserpentis* (site Broken Spur), cette dernière espèce étant retrouvée sur les sites plus méridionaux (Snake Pit, Logatchev) (Figure 1.17). En plus de la différence de profondeur et donc de pression hydrostatique, ces trois sites principaux possèdent des caractéristiques physico-chimiques différentes (Charlou et al., 2000) (Table 4).

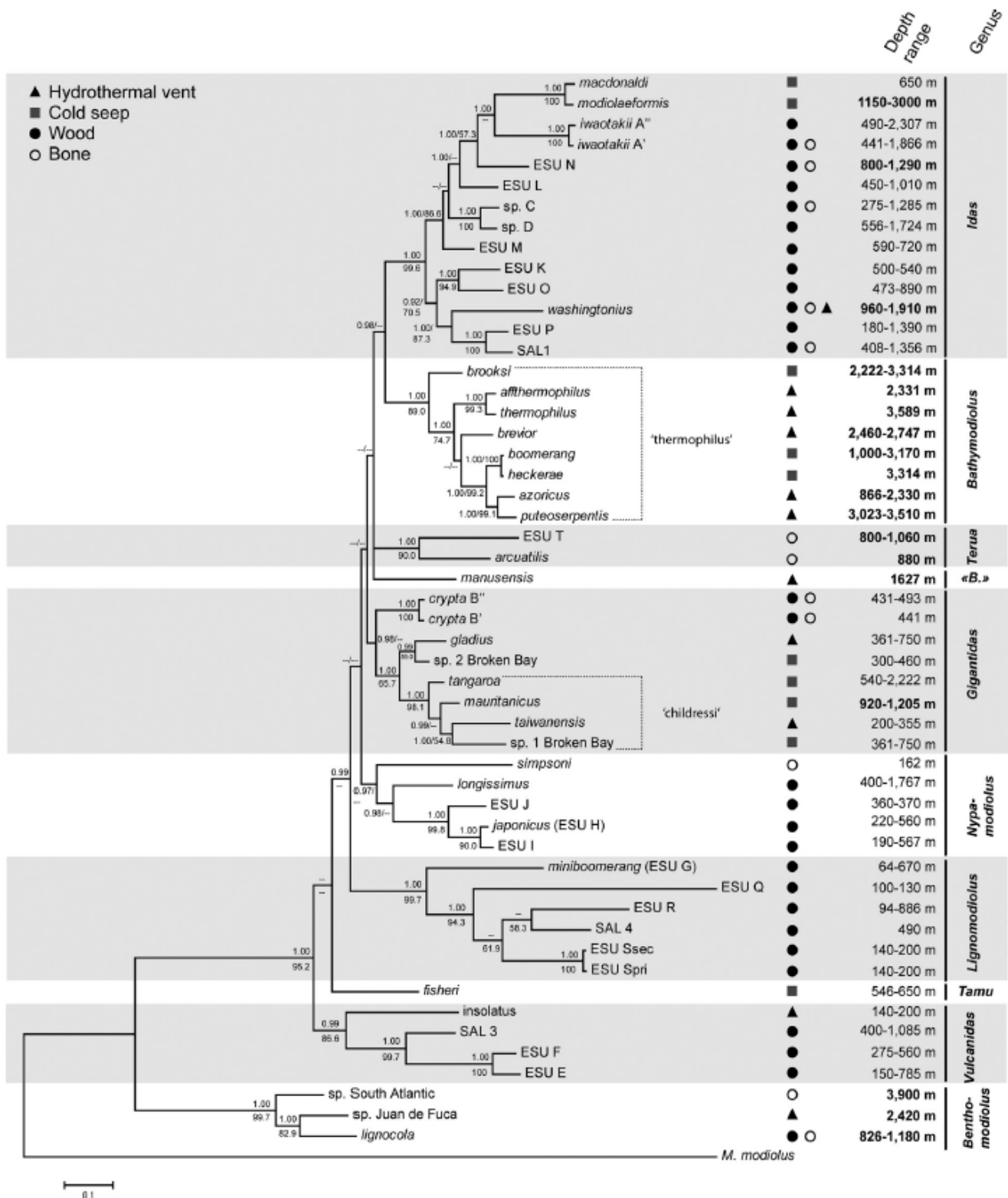


Figure 1.16: Arbre phylogénétique des Bathymodiolinae (Thubaut et al 2013)

Tableau 1.4: Concentration en composés réduits, métaux et métaux lourds des fluides hydrothermaux des sites Menez Gwen, Lucky Strike et Rainbow de la dorsale médio-Atlantique. (Boutet et al 2011)

	Menez Gwen (37°50'N)	Lucky Strike (37°17'N)	Rainbow (36°14'N)
<i>Physical and chemical characteristics</i>			
Depth (m)	850	1700	2300
Temperature (°C)	265-284	152-333	360-365
pH	4.2-4.8	3.5-4.9	2.8-3.1
Fe (mg l <sup>-1</sup> )	1.3-1.6	1.7-48	1339
Mn (mg l <sup>-1</sup> )	3.2-3.7	4.2-24.7	123
Cu (mg l <sup>-1</sup> )	40-180	60-1650	8900
Zn (mg l <sup>-1</sup> )	0.16-0.33	0.33-3.79	10.5
Cd (mg l <sup>-1</sup> )	1.01-1.34	2.02-8.85	14.6
Pb (mg l <sup>-1</sup> )	4.4-11.6	7.2-26.9	30.6
H <sub>2</sub> S (mM)	1.3-1.82	0.6-3.3	1-2.52
CH <sub>4</sub> (mM)	1.7	0.52	2.5

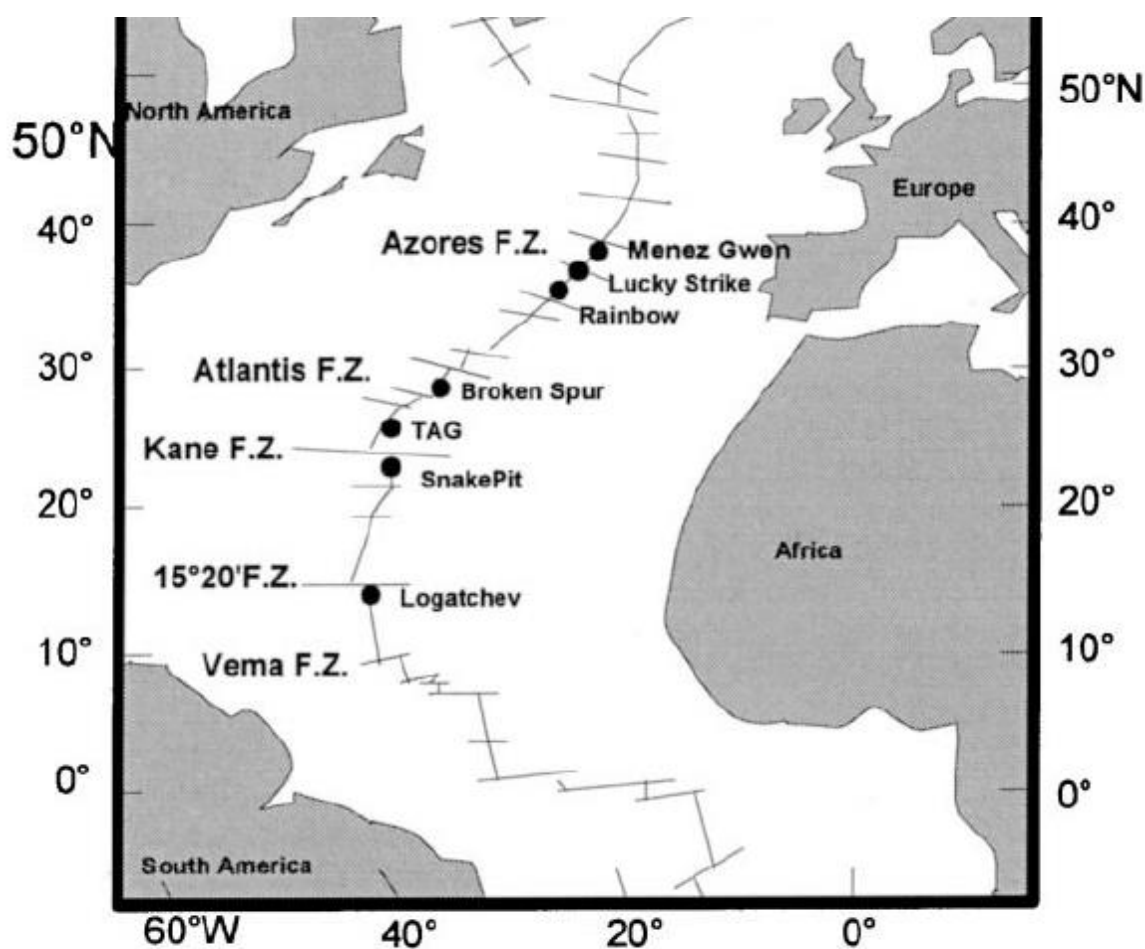


Figure 1.17 : Carte des différents sites hydrothermaux connus de la dorsale médio-Atlantique. (Charlou et al 2000)



Ces moules ont colonisé les abords des sites hydrothermaux de la MAR et peuvent vivre isolées en faible densité (de 0.04 à 1.5 ind/m<sup>2</sup>) ou en groupe comportant plus de 700 ind/m<sup>2</sup> et couvrir parfois de très grandes étendues, jusqu'à 10000 m<sup>2</sup>, avec une densité entre 10 et 250 ind/m<sup>2</sup> (Colaco et al., 1998)(Figure 1.18). Ces moulières (mussel bed en anglais) se situent à proximité (entre 1 et 3 m) des sorties de fluides hydrothermaux pour Menez Gwen et Lucky Strike, dans des zones où la température peut fluctuer de 6°C à 24°C. A Rainbow, les moules sont plus éloignées des fumeurs, très actifs sur ce site, et la température se situe plutôt entre 10 et 15 °C (Desbruyères et al., 2001). Lorsque les sorties de fluide déclinent ou disparaissent, ces moulières subissent une forte mortalité qui se traduit par l'observation de coquilles vides de moules aux alentours (Van dover et al. 2002).

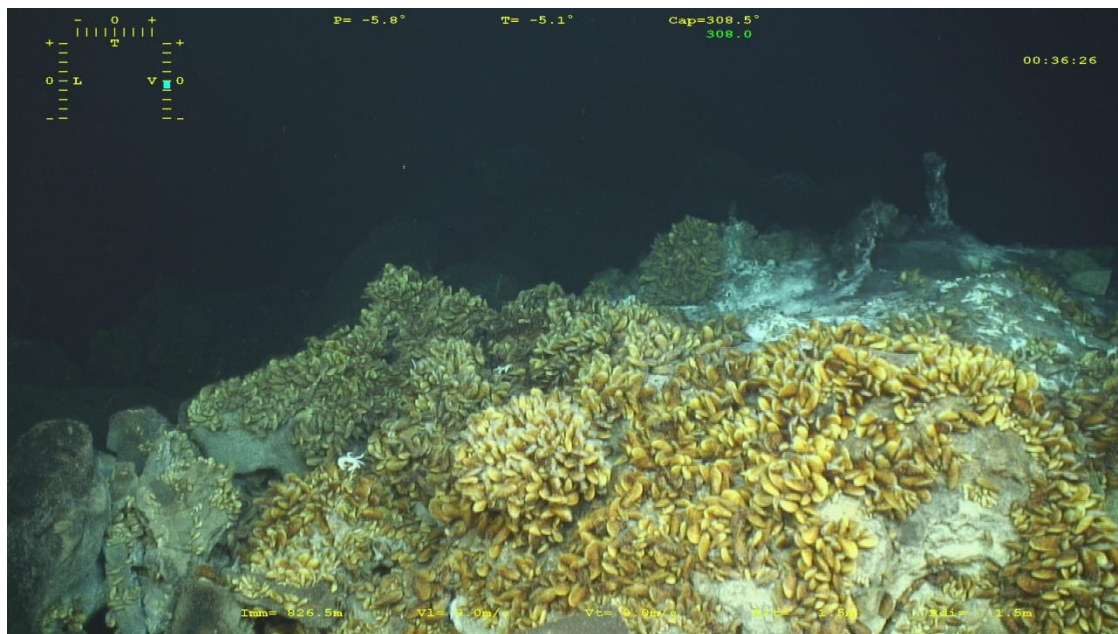


Figure 1.18 : Amas de *B.azoricus* au niveau du site Menez Gwen (-800m) de la dorsale médio-Atlantique durant la mission BioBaz 2013 plongée 515 ©Ifremer

### 3.2.2. Caractéristiques des moules *B.azoricus*

Comme il a été mentionné précédemment, *Bathymodiolus azoricus* est un bivalve symbiotique de la famille des mytilidés. Ce sont, comme les autres mytilidés des animaux filtreurs, possédant les organes nécessaires à ce mode de nutrition. La majorité des Bathymodiolinae, de par leur vie symbiotique ont cependant un tube digestif réduit et droit, et des branchies hypertrophiées (Le Pennec et al 1990). *B. azoricus* possède un tube digestif

enroulé suggérant, malgré la présence de symbiotes, une activité de filtration non-négligeable. Les branchies constituent le tissu d'accueil des symbiotes, ce qui explique leur hypertrophie. Les filaments qui constituent les branchies sont divisés en trois parties : une partie ciliée terminale, une zone de transition (non-ciliée), et une zone de bactériocytes (Fiala Medioni et al. 2002; Distel et al. 1995). Les bactéries symbiotiques sont localisées dans cette troisième zone, dans la partie apicale des bactériocytes (Le Pennec et Hily 1984).

### 3.2.3. Caractéristiques de l'association symbiotique

#### a. Description de la symbiose

*Bathymodiolus azoricus* vit en double endosymbiose, hébergeant dans les bactériocytes, deux types de  $\gamma$ -protéobactéries (Distel et al., 1995). Celles-ci diffèrent d'un point de vue phylogénétique et physiologique (Fiala Medioni. et al. 2002; Duperron et al. 2006) (Figure 1.19). Les symbiotes sulfo-oxydants (SOX) sont présents chez la majorité des bivalves symbiotiques et oxydent le sulfure d'hydrogène tandis que les bactéries méthanotrophes (MOX) utilisent l'oxydation du méthane (Cavanaugh et al., 1992). Leur morphologie est elle aussi différente, les bactéries MOX étant allongées (1,25  $\mu\text{m}$  de diamètre) et composées de membranes intra-cytoplasmiques empilées, tandis que les bactéries SOX sont de plus petite taille (0,35  $\mu\text{m}$ ). Au sein d'un bactériocyte ces bactéries symbiotiques sont localisés dans des vacuoles intra-cytoplasmiques qu'elles partagent ou non (Fiala Medioni. et al. 2002) (Figure 1.20). Cette symbiose permet donc à l'hôte d'avoir accès aux nutriments *via* ses symbiotes, ce qui ne l'empêche pas *a priori* de pouvoir filtrer les particules présentes dans son environnement (Le Pennec & Hily 1984, Le Pennec et al 1990). Ce maintien des mécanismes de filtration permet en outre de nourrir les symbiotes grâce au courant d'eau généré qui apporte les composés réduits dissous dans l'eau et nécessaires au métabolisme chimiotrophe. En effet, les moules ne possèdent pas de protéines capables de fixer ou de transporter le méthane ou les sulfures et sont donc dépendantes de la diffusion de ces gaz depuis l'eau de mer jusque dans leurs branchies où résident les symbiotes. Ces derniers sont acquis par l'hôte à partir de l'environnement, par transmission horizontale. Salerno et collaborateurs en 2005 ont observé la présence des deux endosymbiotes dans le manteau et dans l'intestin de *B.*

*azoricus* au stade post-larvaire et juvénile. Les auteurs ont alors suggéré une infection initiale dans le manteau puis une migration des bactéries vers les branchies (Salerno et al., 2005).

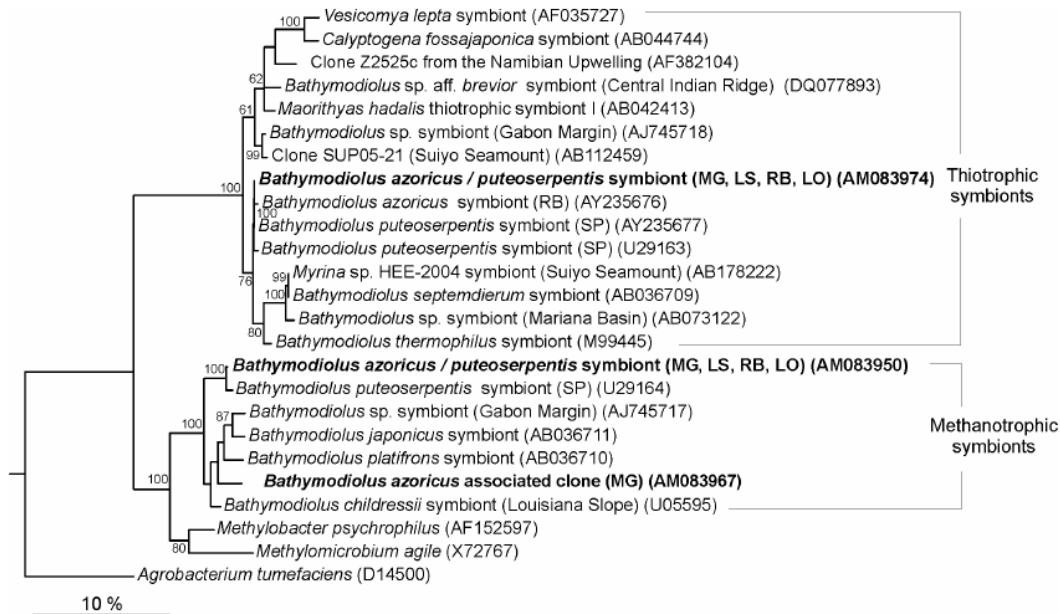


Figure 1.19: Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ARNr 16S des endosymbiontes méthanotrophes et sulfoxydants associés aux Bathymodiolinae du nord de la dorsale médio-Atlantique (Duperron et al 2006).

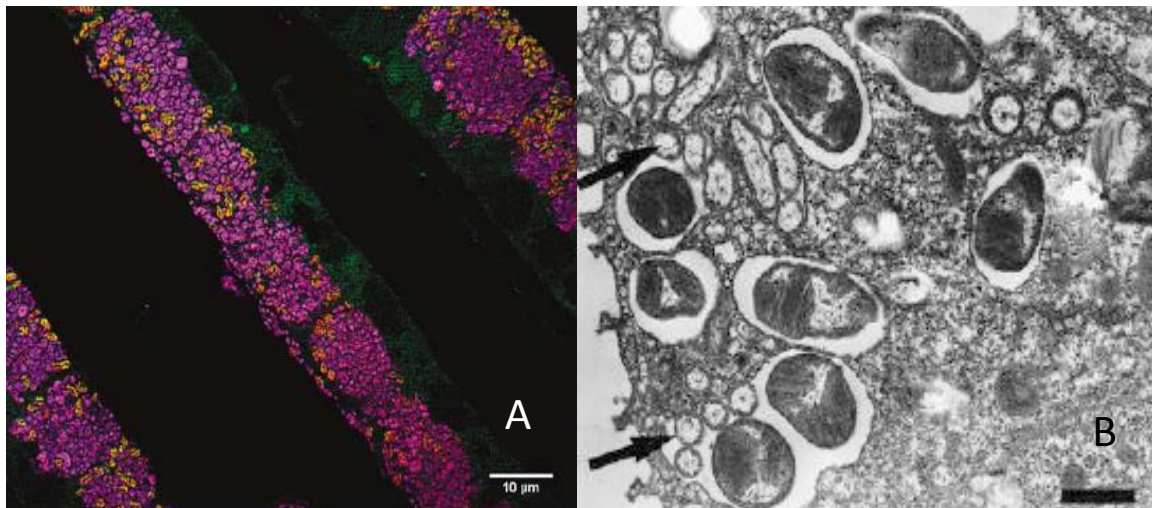


Figure 1.20 : A- Section transversale de filaments branchiaux de *Bathymodiolus azoricus* en FISH. Les bactéries sulfoxydantes sont en violet, tandis que les bactéries méthanotrophes sont en orange (Halary et al 2008) B- Observation au microscope électronique à transmission de bactéries symbiotiques dans un bacteriocyte de *B. azoricus* du site Lucky Strike. Les flèches représentent les bactéries sulfoxydantes (les plus petites) partageant leur vacuole avec des bactéries méthanotrophes. (Fiala-Medioni et al 2002)

## b. Caractéristiques physiologiques des deux types de symbiotes

L'impossibilité jusqu'à présent de cultiver au laboratoire les symbiotes chimiosynthétiques limite le spectre des méthodes d'analyse. Ainsi, les caractéristiques du métabolisme des symbiotes chimiosynthétiques sont déduites à partir des données d'activité enzymatique, de discrimination isotopique (isotopes stables), et depuis peu du contenu de leur génomes et protéomes.

### - Bactéries méthanotrophes

Les bactéries méthanotrophes utilisent le méthane ( $\text{CH}_4$ ) comme source de carbone et d'énergie. La première étape de l'oxydation du méthane en  $\text{CO}_2$  est la conversion en méthanol grâce à l'enzyme méthane monooxygénase (MMO). Le méthanol est à son tour oxydé par la méthanol déshydrogénase (MDH) en méthanal (formaldéhyde). Celui-ci est alors intégré dans la voie du ribulose monophosphate (RuMP), dans lequel trois molécules de formaldéhyde sont assimilées, menant à la formation de l'hexulose-6-phosphate puis du fructose-6-phosphate (Hanson and Hanson, 1996) (Figure 1.21).

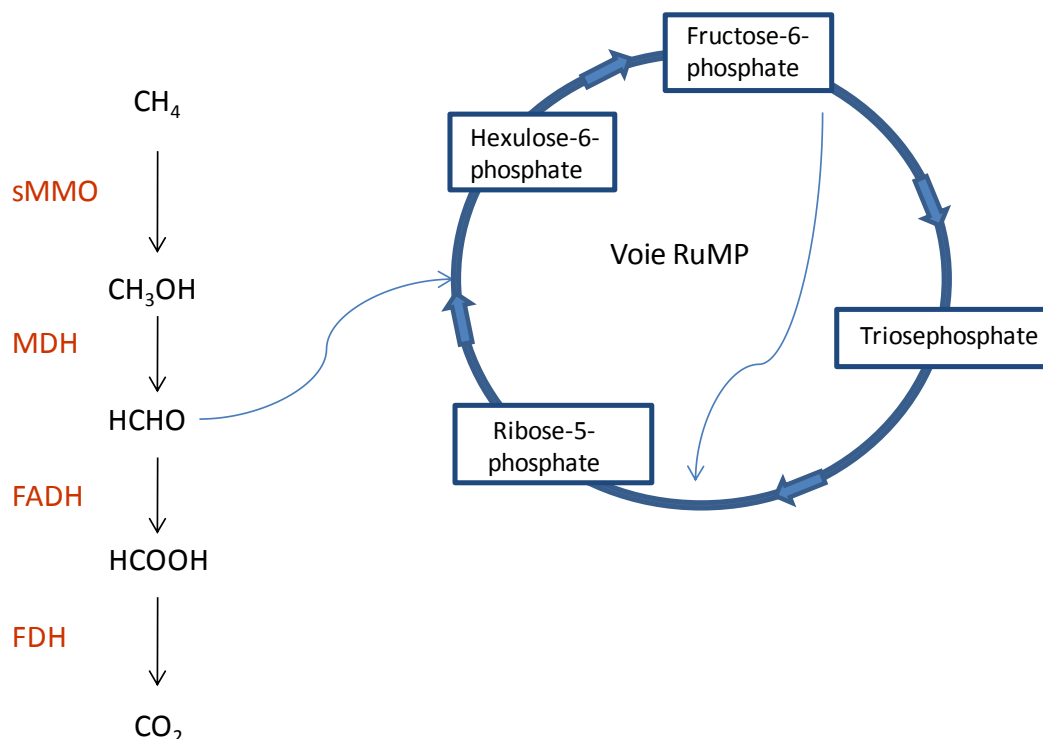


Figure 1.21 : Schéma simplifié de la voie d'oxydation du méthane et du ribulose monophosphate (RuMP) chez les endosymbiontes MOX. Adapté de Hanson & Hanson 1996.

Le méthanal qui n'est pas utilisé pour alimenter la voie RuMP sera converti en  $\text{CO}_2$ . L'oxydation du  $\text{CH}_4$  permet la formation d'énergie et de  $\text{CO}_2$  qui seront en partie transférés à l'hôte.

- Bactéries sulfo-oxydantes

Les bactéries sulfo-oxydantes utilisent le sulfure d'hydrogène comme source d'énergie principale (Figure 1.22) et le dioxyde de carbone comme source de carbone.

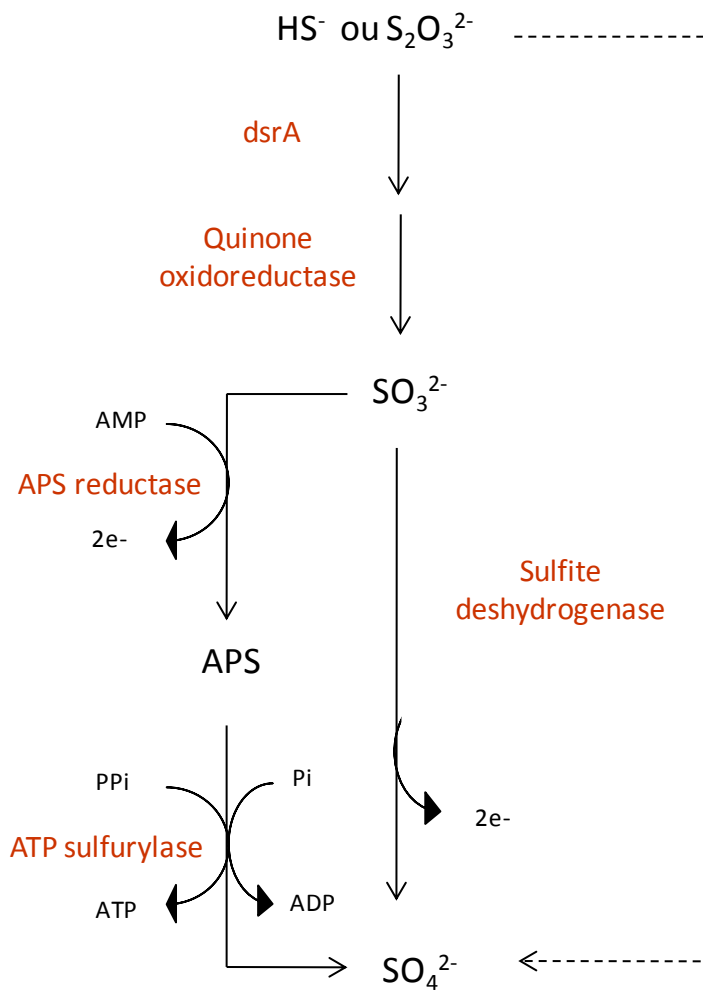


Figure 1.22: Schéma simplifié de la voie d'oxydation du sulfure d'hydrogène chez les endosymbiontes SOX. En rouge: les enzymes, les flèches en pointillés représentent la possibilité que l'enzyme SOXB catalyse cette réaction. Adapté de Beller et al 2006.

Comme indiqué dans la figure 1.22, cette voie d'oxydation du sulfure d'hydrogène implique trois enzymes clefs, localisées le plus souvent dans le cytoplasme, libérant électrons et ATP

qui vont alimenter le cycle de Calvin Benson-Bassham. Ce dernier incorpore le CO<sub>2</sub> issu de l'environnement grâce à la RubisCO et utilise l'ATP issu de l'oxydation des sulfures afin de former du glucose sous la forme de glycéraldehyde-3-phosphate (G3P). Le G3P est ensuite utilisé *via* la voie de la néoglucogenèse et mène à la conversion du phosphoenolpyruvate en pyruvate qui sera incorporé dans le cycle de Krebs (ou TCA cycle, TriCarboxylic Acid cycle) afin de produire de l'énergie qui pourra être en partie transférée à l'hôte (Arndt et al., 2001; Beller et al., 2006; Friedrich et al., 2001). Ces connaissances sur les bactéries sulfo-oxydantes ont été apportées en majorité par le séquençage du génome de bactéries chimioautolithotrophes libres (Scott et al., 2006).

### 3.2.4. Relations hôte-symbiotes

L'étude des relations hôte-symbiotes et des apports réciproques entre *B. azoricus* et ses symbiotes est limitée, d'une part car les symbiotes ne sont pas cultivables et d'autre part car les expériences *in vivo* sur l'hôte sont très réduites du fait de la difficulté de collecte et de maintien au laboratoire. Cependant dès 1987, Fischer et collaborateurs ont montré *via* l'utilisation d'isotopes stables (<sup>13</sup>CO<sub>2</sub> et <sup>13</sup>CH<sub>4</sub>) que le carbone inorganique métabolisé par les symbiotes était transféré à l'hôte (Colaço et al. 2002; Fisher et al. 1987). Ainsi, les symbiotes représenteraient le principal apport en nutriment. Cet apport peut se faire *via* un transfert de molécules organiques ou *via* une forme de digestion du symbiote lui-même (Felbeck & Somero 1982, Fiala-Medioni et al 1994). Le transfert de molécules organiques aussi probable qu'il soit reste quantitativement mal établi, mais Fiala-Medioni et co-auteurs ont étudié l'activité enzymatique de lysozymes, protéines impliquées dans la digestion des parois bactériennes. Cette étude a été réalisée en comparant deux bivalves hydrothermaux symbiotiques à des bivalves non-symbiotiques. L'activité de lyse bactérienne des lysozymes s'est révélée nettement supérieure chez les espèces hydrothermales. Ces résultats leur ont permis de formuler l'hypothèse que les bactéries symbiotiques pouvaient être digérées par l'hôte comme source de nutriments (Fiala-Médioni et al. 1994).

### 3.2.5. Relations holobionte-environnement

Comme dans toute association symbiotique, *B. azoricus* et ses symbiotes représentent un organisme fonctionnel en soit, appelé aussi holobionte. Ainsi, chaque acteur de la symbiose



interagit avec l'autre et avec l'environnement. Les sources hydrothermales constituent un environnement fortement hétérogène, que ce soit en termes de température ou de concentrations en composés dissous dans l'eau. *B. azoricus* réagit de façon flexible à ces fluctuations. En effet en 2002, 2006 et 2011, Fiala-Medioni, Duperron et collaborateurs ainsi que Boutet et collaborateurs ont montré que *B. azoricus* vit en symbiose avec un *ratio* de bactéries sulfo-oxydantes vs. méthanotrophes variable en fonction des concentrations respectives en sulfures et en méthane mesurées dans l'environnement (Boutet et al., 2011; Duperron et al., 2006; Fiala-Médioni et al., 2002; Riou et al., 2008). De plus, des expériences en aquarium réalisées sur des individus de Menez Gwen maintenus à pression atmosphérique, et ayant subi des pulses de sulfure d'hydrogène ont montré une augmentation significative de la densité des bactéries SOX dans les branchies (Halary et al., 2008). Un autre exemple rapporté par Kadar et collaborateurs (2005) montre que des moules, gardées en aquarium à pression atmosphérique durant 30 jours, ont perdu la quasi totalité de leurs symbiotes. Suite à cela, des composés réduits ont été ajoutés dans le milieu induisant une ré-acquisition des bactéries symbiotiques (Kádár et al., 2005). Des expériences menées par Bettencourt et collaborateurs à Lucky Strike (-1700m) et Menez Gwen (-800m) ont montré un différentiel d'expression de certains gènes impliqués dans l'immunité (PGRP, calcinorectin etc) à ces deux profondeurs (Bettencourt et al., 2014). Ces deux sites n'ayant pas la même concentration en composés réduits (Tableau 4), cela suggère que l'environnement et/ou le ratio de symbiotes SOX/MOX ont un effet sur l'expression des gènes de l'immunité de *B. azoricus*.

Nous avons ainsi montré dans cette partie que la double endosymbiose de *Bathymodiolus azoricus* avec ses bactéries SOX et MOX était plastique, notamment en fonction des paramètres de l'environnement. De plus, *Bathymodiolus azoricus* peut supporter des processus de perte et ré-acquisition de ses symbiotes, potentiellement *via* les mêmes mécanismes que ceux impliqués dans leur transmission horizontale. Ces données biologiques nous ont permis d'envisager et de mettre en place des expériences *in situ* de perte, de ré-acquisition ou de maintien de symbiotes dans la perspective d'identifier, par des approches complémentaires de protéomiques et de transcriptomiques, les acteurs moléculaires impliqués dans ces processus. Ces approches « omiques » ont été possibles grâce à l'effort de séquençage du transcriptome et du génome de *B. azoricus* développé au laboratoire ces dernières années. Ces différents aspects, tant biologiques que méthodologiques, nous amènent à envisager *Bathymodiolus azoricus* comme un modèle particulièrement intéressant pour l'étude de la symbiose en milieu chimiosynthétique.





# Chapitre II

## Résultats préliminaires

Ce chapitre correspond à une étude effectuée en amont de cette thèse. Ces résultats ont constitué le terreau de base de cette dernière et nous ont menés à la mise en place d'un protocole expérimental de thèse permettant de répondre à la question des interactions hôte-symbiote de façon pertinente.

### Résumé de l'article en cours de révisions pour Symbiosis

Les sources hydrothermales profondes sont situées au niveau des dorsales océaniques et sont caractérisées par des conditions physico-chimiques dites extrêmes (températures élevées, pH acide, présence de composés réduits de types  $H_2S$  et  $CH_4$ , métaux lourds). Malgré ces conditions, une faune dense s'est installée aux abords de ces cheminées hydrothermales. La présence d'invertébrés marins repose sur des adaptations à ces facteurs et, pour ceux formant la vaste majorité de la biomasse, sur leur capacité à vivre en symbiose avec des bactéries chimiosynthétiques. En effet notre organisme d'étude *Bathymodiolus azoricus* vit en symbiose avec des  $\gamma$ -protéobactéries de type sulfoxydante (SOX utilisation de l' $H_2S$  comme source d'énergie et du  $CO_2$  comme source de carbone) et de type méthanotrophe (MOX, utilisation du  $CH_4$  comme source d'énergie et de carbone). Ces bactéries sont hébergées dans des cellules épithéliales spécialisées situées dans le tissu branchial de la moule : les bactériocytes. De plus, *B. azoricus* est capable de moduler le nombre de symbiotes en fonction des conditions du milieu, et principalement de la concentration du fluide en composés réduits. Dans cette étude nous nous sommes intéressés à la régulation et au maintien de la charge symbiotique dans les branchies de *B. azoricus* via une approche métagénomique. Nous avons ainsi comparé le protéome branchial d'individus de populations natives (Menez Gwen, -800m) fortement chargés en symbiotes (SOX/MOX+) avec celui d'individus faiblement chargés (SOX/MOX-) par une technique de protéomique classique (électrophorèse bidimensionnelle/spectrométrie de masse). La charge des individus en bactéries SOX et MOX a été préalablement mesurée par PCR quantitative sur les gènes

ARNr 16S spécifiques de chaque type de symbiotes. Dans un second temps, nous avons « forcé le système » en induisant une perte symbiotique expérimentale et avons comparé le protéome branchial d'individus issus de cette expérimentation avec celui d'individus issus d'une population naturelle possédant une charge symbiotique moyenne (SOX/MOX +/-).

Peu de variations ont été observées entre les protéomes branchiaux d'individus fortement chargés et faiblement chargés, issus de la population naturelle (SOX/MOX+ vs SOX/MOX -). Ceci peut être expliqué par une tolérance de *B. azoricus* à une forte variabilité de la charge symbiotique, n'entraînant alors pas un remaniement majeur du protéome branchial.

La comparaison des protéomes branchiaux entre individus issus de population naturelle (SOX/MOX+/-) et individus ayant expérimentalement perdu leurs symbiotes, révèle des changements métaboliques plus drastiques. En effet 32 protéines de l'hôte sont différentiellement exprimées entre ces deux conditions. Parmi celles-ci 9 pourraient être impliquées dans une réponse cellulaire universelle au stress, et 23 seraient spécifiques de la réponse à la perte de symbiotes.

L'identification de ces protéines nous a permis d'observer un impact de la perte de symbiotes sur le métabolisme induisant une réorientation des voies directes vers l'utilisation d'énergie dite de réserve. D'autre part, il semblerait que la perte de symbiotes associée à une chute du métabolisme global induise l'entrée en apoptose de certaines cellules. Enfin nous avons pu observer la surexpression de domaines LRR (Leucine Rich Repeat) impliquée dans la réponse immunitaire, notamment dans la voie Toll, suggérant une implication du système immunitaire de l'hôte dans la perte symbiotique.

Ces résultats et la technique qui y est associée, bien que prometteurs, présentent certaines limites. Afin de nous en affranchir, nous avons mis en place une méthodologie qui sera présentée dans les chapitres III et IV.

**Response of deep sea mussel *Bathymodiolus azoricus* to a symbiont content variation. A proteomic approach**

Camille Detree<sup>1,2</sup>, Joëlle Vinh<sup>3</sup>, Emmanuelle Demey Thomas<sup>3</sup>, Iman Haddad<sup>3</sup>, François H. Lallier<sup>1,2</sup>, Arnaud Tanguy<sup>1,2</sup>, Jean Mary<sup>1,2</sup>

1- Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 7144, Equipe ABICE, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

2- CNRS, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

3- ESPCI ParisTech, CNRS, USR 3149, Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris Cedex 05, France

Keywords: *Bathymodiolus azoricus*, symbiosis, hydrothermal vent, proteomics.

## **Abstract**

Dual endosymbiosis between the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* and its symbionts -sulphide-oxidising (SOX) and methanotrophic (MOX) bacteria- is based on the exchange of nutrients. Symbionts are harboured in specialised gill cells of the host, which suggests the presence of specific recognition mechanism between host and symbiont that leads to the internalisation of the latter. To better understand the contribution of the host in the recognition and maintenance of this association, a classical 2DE-based proteomics approach has been implemented. Individuals from a natural population (Menez Gwen, Mid Atlantic Ridge) were collected, and the gill proteomes of individuals with high or low symbiotic charge were compared. Mussels from natural populations were also experimentally starved in aquaria to induce the loss of symbionts. Gill proteome of mussels without symbiont were compared to those from natural population with an average symbiotic charge. The protein contents of spots showed specific changes following the loss of symbionts and allowed us to identify 7 up-regulated and 33 down-regulated host proteins. Among those, we identified proteins involved in innate immunity and apoptosis suggesting a role of these mechanisms in the regulation of this association.

## 1 Introduction

The genus *Bathymodiolus* has a worldwide distribution in chemosynthesis-based ecosystems. Indeed, twenty two species of *Bathymodiolus* have been described to date in the Pacific, Atlantic and Indian Oceans (Dechaine and Cavanaugh, 2005; Miyazaki et al., 2010). All of these species harbour intracellular symbionts in specialised gills cells called bacteriocytes (Cavanaugh et al., 1987, 1992; Fisher et al., 1987). In this light-deprived environment, symbiotic bacteria ensure the primary production. These bacteria can be sulphide - oxidizing bacteria (SOX) or methanotrophic bacteria (MOX), and are phylogenetically and physiologically distinct  $\gamma$  proteobacteria (Dechaine and Cavanaugh, 2005; Distel et al., 1995; Nelson et al., 1995). SOX and MOX bacteria oxidize reduced compounds (methane, sulphide, hydrogen) and produce organic matter, with which they provide the host. Among these 22 species of *Bathymodiolus* some host one type of symbiont or another, and some host both symbionts. Indeed, in a methane-rich environment, such as cold seeps in the Gulf of Mexico, *Bathymodiolus Childressi* (Barry et al., 2002; Childress et al., 1986; Fujiwara et al., 2000) is strictly associated with methanotrophic symbionts whereas in sulphide-rich environment (hydrothermal vent of the East Pacific Rise), *Bathymodiolus thermophilus* harbours only SOX bacteria (Nelson et al., 1995). On the Mid-Atlantic Ridge (MAR), where concentrations of methane and sulphide are both very significant (Douville et al. 2002; Charlou et al. 2000, 2002) *Bathymodiolus azoricus* (Von Cosel et al., 1999), harbours a double endosymbiosis with both SOX and MOX bacteria. This dual endosymbiosis was shown to respond flexibly to differences in vent chemistry (De Busserolles et al., 2009) especially to the availability of reduced compound ( $H_2S$ ,  $CH_4$ ,  $H_2$ ) in the environment (Colaço et al., 2002; Duperron et al., 2006; Petersen et al., 2011). Indeed Boutet and collaborators compared two sites-with different concentration of methane- located on the MAR, and showed that a higher abundance of MOX was found in mussels that live where the concentration of methane was higher

(Boutet et al., 2011). Moreover the plasticity of this symbiosis was also documented experimentally. Mussels kept in aquaria with seawater free of dissolved sulphide for 30 days, gradually lose their symbionts (Kádár et al., 2005). More recently, Halary and collaborators used 3D FISH to show that mussels kept in aquaria (4°C/1 atm) and exposed to artificial pulses of sulphide exhibited an increase in SOX content in their gills (Halary et al., 2008).

Although several studies focused on the plasticity of *B. azoricus* symbiosis, little is known about molecular actors of recognition, maintenance and regulation of symbionts. To shed some light on this process, a classical 2DE-MS approach was used. This approach was based on the comparison of gill proteomes of animals under different conditions. First, mussels from natural population (MG) with either high or low symbiont charge were compared. Then an experimental loss of symbiont by starvation in aquaria (without H<sub>2</sub>S nor CH<sub>4</sub>) was performed and individuals from this experiment were compared to natural population (MG) individuals.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Animal collection

*Bathymodiolus azoricus* were collected at the Menez Gwen vent site (37°51'N and 31°31.2'W) on the Mid-Atlantic Ridge, during the BioBaz Initiale cruise (July 2011) using the Remotely Operated Vehicle (ROV) Victor. After collection, mussels were kept in temperature-insulated boxes with vent seawater and brought onboard. Mussels dedicated to natural population studies were immediately dissected, the gill tissues frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis. Mussels dedicated to starvation experiments were transferred in aquaria with sulphide-free/methane-free seawater (7°C, 1 atm) for 12 days. The mussels were then dissected and gill tissues frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

### 2.2 Quantification of symbiont content by real-time PCR

Genomic DNA of both mussels and symbiont bacteria was extracted from gill tissue using CTAB/PVP extraction procedure (2% CTAB, 1% PVP, 1.4 M NaCl, 0.2% mercaptoethanol, 100 mM Tris HCl pH 8, 0.1mg. mL<sup>-1</sup> proteinase K, 1 mg.mL<sup>-1</sup> lysozyme). Tissues were incubated for 1h at 60°C for complete digestion. An equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) was then added to the solution and tubes were inverted gently to mix for 5 minutes. The mix was centrifuged 10 min at 12,000 rpm at 4°C and the supernatant was carefully collected into a new tube, and DNA was precipitated with 2/3 volume of cold isopropanol, and kept 1 h at -20°C. The DNA pellet was recovered by centrifugation (12,000 rpm/4°C/20min), washed with 70% cold ethanol, air-dried and resuspended in 200 µl sterile water. Quantity and quality of DNA were assessed *via* UV absorbance (OD 260/280/230), using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Delaware, USA). The relative quantity of symbionts was estimated by real-time PCR amplification using 16S specific primers designed according to the probes developed previously for FISH analysis (Duperron *et al.*, 2006) (Table 1). All experiments were carried out using a Chroma4 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA) and 1× ABsolute™QPCR SYBR® Green mix (ABgene, Epsom, UK), 70 nM of each primer, and 2.5 ng of DNA in a final volume of 10 µl. A 120 bp-fragment of cytosolic malate dehydrogenase gene (MDH) from the host was used as an internal PCR reference (Table 1). The relative quantity (RQ) of each symbiont type was estimated by using the comparative Ct method formula:  $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ , ( $\Delta Ct = Ct_{16S} - Ct_{MDH}$ ).

### 2.3 Protein extraction

Gill tissues were ground in a precooled mortar in the presence of liquid nitrogen and the homogenate was precipitated for 3 hours at -40°C with 1mL ice-cold acetone/TCA (10%)/2 $\beta$ -mercaptoethanol (0.07%) solution. After centrifugation at 12,500g for 15min at 4°C, the supernatant was removed and the pellet was rinsed with ice-cold acetone/ (0.07%) 2 $\beta$ -mercaptoethanol solution. After another centrifugation (12,500g/12min/4°C) the pellet was air-dried and resuspended in a sample buffer (6M Urea /2 M Thiourea/0.02% CHAPS /65mM DTT/1% ampholytes–Bio-Lyte®, BioRad, Marnes-la-Coquette, France), vortexed at room temperature until dissolved and centrifuged again (10000g/10min/4°C). The supernatant was collected and the protein concentration was measured with the Bio-Rad Protein Assay kit (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Isoelectrofocusing was performed with the Protean IEFCell system (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Immobilized pH 4-7 linear gradient strips (IPG strips, 17 cm) were actively rehydrated (50V, 12hours at 20°C) with the sample buffer supplemented with 0.002% bromophenol-blue containing 400 $\mu$ g of protein. After rehydration, IEF voltage was raised with a rapid slope to 10 000V and strips were run at 20°C, with current limit 50 mA/strips, until 60 000 Vh. Prior to the second dimension, the proteins were reduced and then carbamidomethylated with 65mM DTT and 16mM iodoacetamide respectively in equilibration solution (6M urea, 33% glycerol, 1% SDS, 50mM Tris-HCl pH 8.8, 0.002% bromophenol blue). The second dimension was run on PAGE-SDS (12%). Proteins were visualized with Brilliant Blue G-Colloidal (Sigma, Saint-Louis, Missouri) according to manufacturer's instructions.

### 2.4 2-D gel images analysis

Stained gels were scanned with Labscan 5 (1.0.8) software (GE Healthcare, Orsay, France). Image analysis was performed with Image Master 2-D platinum (GE Healthcare, Orsay, France). One anchor spot was manually defined after which matching of spots between different gels was performed automatically by Image Master. The automated matching of the gels was checked manually and corrected when needed. Spots were quantified and normalized using the volume criterion, thus, for each spot the % volume was calculated as its volume divided by the total volume of matched spots. A Student's t-test was used to compare spot volumes between gels of each experimental condition. Only spots combining two-fold expression differences and exhibiting *P* values below 0.05 were considered.

### 2.5 In-gel enzymatic digestion of protein and MS analysis



Selected spots were excised and washed with 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and dehydrated in 100 $\mu\text{l}$  acetonitrile for 15min and finally dried in a vacuum centrifuge. The proteins were then digested overnight by addition of 15 $\mu\text{l}$  trypsin (9ng/ $\mu\text{l}$  trypsin Promega, Madison, WI, USA, in 25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). The resulting peptide mixture obtained was acidified with 5% (v/v) formic acid for 15min at 37°C and supplemented with acetonitrile (100%) for 15min at 37°C, dried in a vacuum and stored at -40°C until analysis. Dry samples were then dissolved in 0.1% TFA/2% acetonitrile, sonicated and desalted using ZipTipC18® column (Millipore, USA) according to the manufacturer's instructions and eluted with 8 $\mu\text{l}$  acetonitrile/TFA (0.1%)(50/50).

A 4800 Proteomics Analyser MALDI TOF/TOF™ mass spectrometer (Applied Biosystems ABI, Framingham, MA) was used for all analyses. Spectra were acquired in the positive ion reflector mode using delayed extraction in the mass range between 700 et 4000 Da with *ca.* 1000 laser shots. Tandem mass spectra MS/MS were obtained using the CID mode off at 2 keV collision energy. Signal-to-noise ratios  $\geq 30$  were required and the Top five most intense peptides per spot were selected automatically for the MS/MS analysis. External plate model calibration was achieved with a standard peptide mix on 500-3400 Da (Proteomix Peptide mix4).

## 2.6 Database searching and protein identification

Protein identification was performed with Mascot (Matrix Science) software, by confronting the collected MS/MS spectra against two different databases: Swissprot UniprotKB (Sprot 2010\_09), and *B.azoricus* translated ESTs databank (Tanguy et al., 2008). The database search was performed for tryptic peptides only with cysteine carbamidomethylation, methionine oxidation and up to two missed cleavages were accepted. Precursor and fragment error tolerances were set to 50 ppm and 0.3 Da, respectively.

### 3 Results and discussion

To improve our knowledge on the symbiosis of *Bathymodiolus azoricus*, a proteomics approach was carried out on gills to obtain a dataset of differentially expressed proteins in response of symbiotic charge variation. We focused our study on the gill proteome of *B. azoricus* because this tissue is hosting symbionts in specialized epithelial cells. Thus, we first compared the gill proteomes of natural-population organisms with a high or low charge of symbionts and then we compared natural-population organisms with experimentally free-symbionts individuals.

#### 3.1 Relative quantification of symbionts content

Before proteomics analyses, the relative symbiotic rate of each type (SOX and MOX) was measured by realtime PCR amplification using 16S specific primers (Fig. 1). The quantification of symbionts contents allowed us to classify and group samples from Menez Gwen natural population (n=33) according to their symbiotic charge. Six individuals were found to have a high symbiotic charge ( $RQ(SOX) > 100$ ,  $RQ(MOX) > 25$ ), and 6 others were found to have a low symbiotic charge ( $RQ(SOX) < 5$ ,  $RQ(MOX) < 1$ ). These two groups were called SOX/MOX+ individuals and SOX/MOX- individuals, respectively. The Kruskal-Wallis test showed a significant difference between SOX contents measured in SOX/MOX+ individuals and SOX contents under other conditions (p-value<0.05). No significant differences were found between Menez Gwen (MG), SOX/MOX- individuals, and experimental individuals for SOX contents (Fig. 1). Significant differences for MOX contents were found between MG and SOX/MOX- individuals and between MG and experimental individuals. Moreover differences between SOX/MOX+ individuals and SOX/MOX- individuals, and SOX/MOX+ individuals and experimental individuals were also significant. For the MOX content, there is no significative differences between MG individuals and SOX/MOX+ individuals or between SOX/MOX- individuals and experimental individuals. Proteomics comparisons were then performed between 4 groups of individuals with different symbiotic contents shown in Figure 1: SOX/MOX+ (n=6); SOX/MOX- (n=6), Experimental (n=6) and SOX/MOX+/- (3 SOX/MOX- and 3 SOX/MOX+).

#### 3.2 SOX/MOX+ individuals vs SOX/MOX- individuals

To deal with the important variability between individuals in natural population, our proteomics study was performed on 6 individuals. Six gels of gills from specimens with high symbiotic contents were compared to 6 gels of individuals with low symbiotic content (Fig.

2). A total of *ca.* 400 spots per gel were detected. Eighteen proteins were differentially expressed between these two conditions out of which 15 were identified by mass spectrometry. Among these 15 peptides, 8 belong to the host and are of particular interest in our study (Fig. 2). Using the SOX/MOX+ state as a reference, 5 proteins are up-regulated and 3 are down-regulated in the SOX/MOX- group (Table 2).

Among the 8 up-regulated proteins, two spots were identified as cytoskeleton proteins:  $\alpha$  and  $\beta$  tubulins (spots 2 and 8). Cathepsin Z (spot 6) is a lysosomal cysteine protease (Falcone et al. 2000). The RNA binding protein (Pno1) (spot 4) is involved in post-transcriptional regulation of rRNA Pno1 can bind transitorily with other protein such as Rio2 kinase, Nob1 or EnP1/Ltv1 to ribosomes to help rRNA maturation (Campbell and Karbstein, 2011). The disulphide isomerase protein (spot 3) catalyses the proper fold of proteins by promoting the reduction/oxidation of disulphide bounds (Wilkinson and Gilbert, 2004).

Among the 5 down-regulated proteins, gelsolin (spot 2) is a constitutive cytoskeleton protein. Proteins of gelsolin family are actin-binding proteins and are key regulators of actin filament dynamic. The 14-3-3 protein (spot 7) is a small regulation protein that binds with signal protein kinases, phosphatase or to receptors such as RCPG (Fu et al., 2000). The Two pore channel 3 protein (TPC 3) (spot 5) is a calcium-dependent channel that is NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphatase)-gated and is present in endolysosomes (Zhu et al., 2010). These differentially expressed proteins suggest an increase of protein synthesis (up-regulation of Pno1 and disulphide isomerase) and a reorganization of cytoskeleton. In addition, the down-regulation of TPC3 and 14-3-3 could correspond to an inhibition of endolysosomal pathway.

However, little variations were observed between organisms with a high and low symbiotic charge. It is possible that the large range of symbiotic charge in natural populations does not induce a large proteomic variation. To go further, mussels from Menez Gwen natural population were starved for 12 days in filtered sea water (1 atm/7°C) without reduced compounds, to experimentally induce the loss of symbionts. The loss of symbionts was verified by quantitative PCR (Fig. 1).

### 3.3 Natural population (SOX/MOX+/-) individuals vs experimental individuals

Among the 54 proteins differentially expressed between these two conditions, 52 were identified by mass spectrometry and 32 belong to the host's proteome (Fig. 3). The SOX/MOX+/- condition was chosen as a reference. Seven proteins were then up-regulated and twenty five down-regulated under the experimental conditions. Seven proteins are up-

regulated in experimental condition, and are involved in different cell processes (Table 3). The G protein family (spot 7) plays a crucial role in signal transduction by linking cell surface receptors to effectors involved in cell signal transduction. The  $\alpha$ -subunit is an enzyme that has a high-affinity binding site for guanine nucleotide (GDP or GTP). This enzyme possesses an intrinsic GTPase activity and can, in response to environmental stimuli, hydrolyse the terminal phosphate of bound GTP to form GDP to induce signal transduction (Hepler and Gilman, 1992). The electron-transfer flavoprotein (spot 14) is involved in lipid metabolism by oxidizing FADH<sub>2</sub> coenzyme during conversion of acyl-CoA to trans  $\Delta^2$ -enoylCoA. This oxidation and ubiquinone reductase reduction, allows electron transfer to mitochondria (Voet and Voet 2005). Two spots correspond to proteins involved in cellular stress and protein folding: prohibitin (spot 13), a chaperon protein that occurs in external mitochondria membranes (Ikonen et al. 1995), and Erp29 (spot 11) transfers chaperone proteins in the endoplasmic reticulum. One spot identified as up-regulated is a cytoskeleton protein: tropomyosin 2 (spot9) (Gunning et al., 2008). VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) (spot 16) is an ion channel of the outer mitochondrial membrane involved in metabolite transport from mitochondria to cytosol. It has also been shown that an up-regulation of VDAC in cells leads to apoptosis (Abu-Hamad et al., 2006; Rostovtseva et al., 2005). Countin2 (spot 33) seems to be involved in multicellular growth and development. Indeed Okuwa and collaborators (2001) performed a loss of gene function on countin 2 in the amoeba *Dictyostelium discoideum* and showed that this protein was important in cell-adhesion and maintenance of multicellular structure (Okuwa et al., 2001). Among the 25 proteins that were down-regulated under experimental condition, we found  $\alpha$  and  $\beta$  tubulins (spot 32 and 6) and cathepsin Z (spot 8), as observed in the comparison between SOX/MOX+ individuals and SOX/MOX- individuals. Copin 3 (spot 3) is a calcium-dependent protein involved in membrane traffic (Creutz et al., 1998; Perestenko et al., 2010). The exact function of this protein is not yet known. TCTP (translationally controled tumor protein) (spot 20) is involved in apoptosis mechanism. It competes with MDM2 ubiquitine ligase (Mouse double minute 2 homolog) and NUMB to occupy the p53 promotor and inhibite its transcription. It has been shown on breast cancer cells that a 50% decrease of TCTP leads to an up-regulation of p53, which leads to the induction of apoptosis (Amson et al., 2011; Bommer and Thiele, 2004). Six identified down-regulated proteins are involved in cellular metabolism: phosphoglycerate kinase 2 (spot 5), cytosolic malate dehydrogenase (spot 12), cytochrome c oxidase (spot 23), subunits  $\alpha$  and  $\beta$  of F1 ATPase complex (spots 28 and 27), mitochondria ATPase pump (spot 4). Phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) catalyzes the seventh glycolysis reaction, which is the

transformation from 1,3-biphosphoglycerate to 3-phosphoglycerate. Cytosolic malate dehydrogenase catalyzes the reaction that turns oxaloacetate to malate. It is implicated in invertebrate's anaerobiosis during starvation or hypoxia by maintaining a low oxaloacetate concentration. Malate thus formed is converted into fumarate which is turned into succinate to produce amino acids (Hochachka and Mustafa 1972). Cytochrome c oxidase (Vb subunit) or IV complex of respiratory chain is localised in mitochondrial membranes. It is the final electron acceptor of the oxidative phosphorylation chain. It allows oxygen reduction, production of two H<sub>2</sub>O molecules and the pumping of four protons out of the mitochondrial matrix. Subunits  $\alpha$  and  $\beta$  of F1 ATPase and complex mitochondria ATPase pump are also involved in the oxidative phosphorylation chain (Voet and Voet 2005). SMU1 (Suppressor Of Mec-8 And Unc-52 Homolog) (spot 26) is involved in mRNA splicing (Spartz et al., 2004). Histone H2A (spot 22), is forming a complex with other histones (H3, H4, H2B) which is the core of nucleosome. Moreover, one fragment was identified as a LRR domain (spots 15 and 21), and belongs to a kinase protein that occurs in different cellular types in eukaryotes. Proteins with LRR domain have been shown to be involved in innate immunity in plants, mammals and invertebrates as *Drosophila melanogaster* (Ronald and Beutler, 2010). In our 2DE gels 2 isoforms of LRR peptides were found. In addition, four stress response proteins were identified: Hsp 70 (spot 18), cold shock DNA binding protein (spot 24), Hsc 70 (spot 31) thioredoxin (spot 30) and glutathione-S-transferase (spot 19). Finally, 4 proteins (spots 1, 10, 29, 25) have no known function.

#### 4 Concluding remarks

Comparison between SOX/MOX+ individuals and SOX/MOX- individuals allowed us to identify 8 proteins differentially regulated. This difference between high and low symbiotic charge is however small and can be explained by the plasticity of *Bathymodiolus azoricus* regarding his symbiotic content. The sheer presence of symbionts, regardless of charge, could require the presence of some proteins, with little or no modulation of abundance. We therefore decided to experimentally induce the loss of symbionts in aquaria to better understand molecular mechanism of communication between host and symbionts. A total of 32 proteins were identified as differentially expressed between experimental individuals and SOX/MOX+/- individuals. Based on these identifications, it was possible to establish a list of proteins that were not *a priori* specific of the experience. Indeed Petrak, Wang and co-authors recently showed the existence of a set of proteins always identified in proteomics studies and involved in an intrinsic universal cellular stress response (Petrak et al. 2008; Wang et al. 2009). These were identified by comparing studies using classic proteomic approaches (2DE-MS) on different model organisms undergoing different kinds of stress. In our study mussels were kept in aquaria without reduced compound (CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>S). These experimental conditions can be considered as a stress. Thus, we decided to exclude those proteins of universal stress response (Table 5) from our conclusions, to focus on proteins specifically involved in a response to the loss of symbionts. Proteins were grouped depending on their biological function.

##### 4.1 Metabolic response to loss of symbionts

The absence of CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>S in aquaria led to a decrease in symbionts content that are expelled or intracellularly digested, eventually resulting in a loss of energy for the host. To survive, individuals need to implement other energetic mechanisms and/or decrease energetic needs. *Bathymodiolus* are mixotrophic organisms. It is therefore possible that, in absence of symbionts, *B. azoricus* favoured the heterotrophic nutrition. However, life in deep-sea hydrothermal vents led to a reduction of *B. azoricus* digestive system, which prevents to filter many suspended particles. Indeed a decrease of the glycolysis enzyme phosphoglycerate kinase 2 (PGK2) was observed, suggesting a decrease of glucidic exogenous intake or intracellular digestion of symbionts. At this time, it becomes necessary for the organism to redirect metabolic pathways by using stored biomolecules that can be used as an energy source. We also observed an increase of electron transfer flavoprotein (ETF) suggesting an increase of fatty acid degradation *via*  $\beta$ -oxidation to supply the respiratory chain in

NADH/NADPH. Reliance on this catabolic pathway helps the organism to maintain its basal metabolism and survive.

#### 4.2 Apoptotic response

Despite the modification of metabolic energy production, the increase in expression of Voltage Dependant Anion Channel (VDAC) in experimental organisms suggests the inability of the organism to supply in energy to the whole organism. In addition, the reduced amount of ATP synthase in mitochondria suggests a decrease in the number of these organites, which can be due to a decrease of global metabolism. Furthermore, translationnal control tumor protein (TCTP), which binds the promoter of elongation factor p53 and inhibits its transcription, is less abundant in experimental organisms, suggesting an over-expression of p53. This latter is involved in DNA degradation. These up and down regulations at the protein level tend to demonstrate an induction of apoptosis in bacteriocytes. This induction can be due to the uselessness of bacteriocytes in absence of symbionts or a necessity for host to save energy for fewer cells.

#### 4.3 Immune response

Two LRR domain proteins were found to be down-regulated in absence of symbionts. In the symbiotic association between legumes and *Rhizobia*, a leucine-rich repeat receptor kinase (SYMRK) has been shown to be involved in early signal transduction in the establishment of symbiosis (Indrasumunar et al., 2015; Stracke et al., 2002). In our study two short peptides were discovered, which may represent only a small part of the kinase protein. Nevertheless as these peptides are present in natural populations and not in experimental individuals they may have an implication in symbiont recruitment.

Overall, in aquaria and without reduce compounds, *Bathymodiolus azoricus* seems to have difficulties to maintain the metabolism that was in place in the presence of symbionts. Some cells may enter in a survival phase by slowing down their metabolism and reorienting it through the recruitment of energy storage. If it is not sufficient to supply the whole organism in energy, it leads to apoptosis in other cells. These data can be correlated with electron micrographs from Kadar and co-authors showing a decrease in the gills cell layer and an increase in lysosomes incidence and number after “purification” during 30 days in identical experiment conditions (Kádár et al., 2005). Although *B. azoricus* is a filter-feeding and heterotrophic organism, the loss of its symbionts seems to deeply affect its metabolism. These

comparisons between gills proteome of organism with a low and a high charge of symbionts, open lines of understanding on adaptation processes of *B. azoricus* in its natural environment. Moreover LRR domain proteins could be interesting candidates to better understand how the host interacts with his symbionts.



## References

- Abu-Hamad S, Sivan S, Shoshan-Barmatz V (2005) The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 : 5787-5792
- Amson R, Pece S, Lespagnol A, Vyas R, Mazzarol G, Tosoni D, Colaluca I, Viale G, Rodrigues-Ferreira S, Wynendaele J, Chaloin O, Hoebeke J, Marine JC, Di Fiore PP, Telerman A (2011) Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat Med* 18 : 91-99
- DeChaine EG, Cavanaugh CM (2006) Symbioses of methanotrophs and deep-sea mussels (Mytilidae : Bathymodiolinae). *Prog Mol Subcell Biol* 41 :227-249
- Barry JP, Buck KR, Kochevar RK, Nelson DC, Fujiwara Y, Goffredi SK, Hashimoto J (2002) Methane-based symbiosis in a mussel, *Bathymodiolus platifrons*, from cold seep in Sagami Bay, Japan. *Invertebrate Biology* , 121:139-158
- Bommer UA, Thiele BJ (2004) The translationally controlled tumor protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol* 36 :379-385
- Boutet I, Ripp R, Lecompte O, Dossat C, Corre E, Tanguy A, Lallier FH (2011) Conjugating effects of symbionts and environmental factors on gene expression in deep-sea hydrothermal vent mussels. *BMC Genomics* 12 :530
- Campbell MD, Karbstein K (2010) Protein-Protein Interactions within Late Pre-40S ribosomes. *Plos One*. 6 : 1-10
- Cavanaugh CM, Levering PR, Maki JS, Mitchell R, Lidstrom ME (1987) Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* 325 : 346-348
- Cavanaugh CM, Wirsén CO, Jannasch HW (1992) Evidence for methylotrophic symbionts in a hydrothermal vent mussel (bivalvia : mytilidae) from the mid-atlantic ridge. *Appl Environ Microbiol* 58 : 3799-3803

- Charlou JL, Donval JP, Douville E, Jean-Baptiste P, Radford-Knoery J, Fouquet Y, Dapoigny A, Stievenard M (2000) Compared geochemical signatures and the evolution of Menez Gwen (37 degrees 50 ' N) and Lucky Strike (37 degrees 17 ' N) hydrothermal fluids, south of the Azores Triple Junction on the Mid-Atlantic Ridge. *Chem Geol* 171 :49-75
- Charlou JL, Donval JP, Fouquet Y, Jean-Baptiste P, Holm N (2002) Geochemistry of high H<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> vent fluids issuing from ultramafic rocks at the Rainbow hydrothermal field (36 degrees 14 ' N, MAR) *Chem Geol* 191 : 345-359.
- Childress JJ, Fisher CR, Brooks JM, Kennicutt MC 2<sup>nd</sup>, Bidigare R, Anderson AE (1986) A methanotrophic marine molluscan (bivalvia, mytilidae) symbiosis : mussels fueled by gas. *Science* 19 : 1306-1308
- Colaço A, Dehairs F, Desbruyères D, Le Bris N, Sarradin PM (2002)  $\delta^{13}\text{C}$  signature of hydrothermal mussels is related with the end-member fluid concentration of H<sub>2</sub>S and CH<sub>4</sub> at the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Cah Biol Mar* 43: 259–262.
- Creutz CE, Tomsig JL, Snyder SL, Gautier MC, Skouri FL, Beisson J, Cohen J (1998) The copines, a novel class of C2 domain-containing, calciumdependent, phospholipid-binding proteins conserved from *Paramecium* to Humans. *J Biol Chem* 273 : 1393–1402
- De Busserolles F, Sarrazin J, Gauthier O, Gelinas Y, Fabri MC, Sarradin PM, Desbruyères D (2009) Are spatial variations in the diets of hydrothermal fauna linked to local environmental conditions? *Deep-Sea Research II* 56 :1649-1664
- Distel DL, Lee HK, Cavanaugh CM (1995) Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 9598-95602
- Douville E, Charlou JL, Oelkers EH, Bienvenu P, Colon CFJ, Donval JP, Fouquet Y, Prieur (2002) The rainbow vent fluids (36 degrees 14 ' N, MAR): the influence of ultramafic

- rocks and phase separation on trace metal content in Mid-Atlantic Ridge hydrothermal fluids. *Chemical Geology* 184: 37-48.
- Duperron S, Bergin C, Zielinski F, McKiness ZP, DeChaine EG, Cavanaugh CM, Dubilier N (2006) A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *B. puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* 8: 1441–1447.
- Falcone FH, Tetteh K, Hunt P, Blaxter ML, Loukas A, Maizels RM (2000) The new subfamily of cathepsin-Z-like protease genes includes *Tc-cpz-1*, a cysteine protease gene expressed in *Toxocara canis* adults and infective stage larvae. *Experimental parasitology* 94: 201-207
- Fisher CR, Childress JJ, Oremland RS, Bidigare RR (1987) The importance of methane and thiosulfate in the metabolism of the bacterial symbionts of two deep-sea mussels. *Mar Biol* 986 : 59-71
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:617-647
- Fujiwara Y, Takai K, Uematsu K, Tsuchida S, Hunt JC, Hashimoto J (2000) Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: influence on host distribution. *Mar Ecol Prog Ser* 208: 147–155
- Gunning P, O'Neill G, Hardeman E, (2008) Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol Rev* 88: 1–35.
- Halary S, Riou V, Gaill F, Boudier T, Duperron S (2008) 3D FISH for the quantification of methane- and sulphur-oxidizing endosymbionts in bacteriocytes of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *ISME J* 2 : 284-292
- Hepler JR, Gilman AG (1992) G proteins. *TIBS* 17:383-387
- Hochachka PW, Mustafa T (1972) Invertebrate facultative anaerobiosis. *Science* 178 :1056-

1060

- Ikonen K, Fiedler K, Parton RG, Simons K, (1995) Prohibitin, an antiproliferative protein, is localized to mitochondria. FEBS Lett 358 : 273-277
- Indrasumunar A, Wilde J, Hayashi S, Li D, Gresshoff PM (2015) Functional analysis of duplicated symbiosis receptor kinase (SymRK) gene during nodulation and mycorrhizal infection in soybean (glycine max) J Plant Physiol 176 : 157-168
- Kadar E, Bettencourt R, Costa V, Serrao Santos R, Lodo-da-Cunha A, Dando PR (2005) Experimentally induced endosymbiont loss and re-acquirement in the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus*. J Exp Mar Bio Ecol 318: 99–110.
- Miyazaki JI, de Oliveira Martins L, Fujita Y, Matsumoto H, Fujiwara Y (2010) Evolutionary process of deep-sea *Bathymodiolus* mussels. PLoS One 5 :e10363
- Nelson DC, Hagen KD, Edwards DB (1995) The gill symbiont of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus* is a psychrophilic, chemoautotrophic, sulfur bacterium. Mar Biol 121 :487-495
- Okuwa T, Katayama T, Takano A, Kodaira K, Yasukawa H (2001) Two cell-counting factors regulate the aggregate size of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. Develop. Growth Differ. 43 : 735–744
- Perestenko PV, Pooler AM, Noorbakhshnia M, Gray A, Bauccio C, Jeffrey McIlhinney RA (2010) Copines-1, -2, -3, -6 and -7 show different calcium-dependent intracellular membrane translocation and targeting. FEBS J 277 : 5174-5189
- Petersen J, Zielinski FU, Pape T, Seifert R, Moraru C, Amann R, Hourdez S, Girguis PR, Wankel SD Barbe V, Pelletier E, Fink D, Borowski C, Bach W, Dubilier N (2001) Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses 476 : 176-180
- Petrak J, Ivanek R, Toman T, Cmejla R, Cmejlova J, Vyoral D, Zivny J, Vulpe CD (2008) Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed

- proteins. *Proteomics* 8 : 1744–1749
- Ronald PC, Beutler B (2010) Plant and animal sensors of conserved microbial signatures. *Science* 330 : 1061-1064
- Rostovtseva T K, Tan W, Colombini M (2005) On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. *J Bioenerg Biomembr* 37 : 129-142
- Spartz AK, Herman RK, Shaw JE (2004) SMU-2 and SMU-1, *Caenorhabditis elegans* homologs of mammalian spliceosome-associated proteins RED and fSAP57, work together to affect splice site choice. *Mol Cell Biol* 24 : 6811–6823
- Stracke S, Kistner C, Yoshida S, Mulder L, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N, Stougaard J, Szczygłowski K, Parniske M (2002) A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417 : 959-962
- Voet D, Voet JG (2005) *Biochemistry*. John Wiley & sons, Hoboken (New Jersey)
- Von Cosel R, Comtet T, Krylova EM (1999) *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from hydrothermal vents on the Azores Triple junction and the Logatchev hydrothermal field, Mid-Atlantic Ridge. *The Veliger* 42: 218-248
- Wang P, Bouwman FG, Mariman EC (2009) Generally detected proteins in comparative proteomics – A matter of cellular stress response? *Proteomics* 9 : 2955-2966
- Wilkinson B, Gilbert HF (2004) Protein disulfide isomerase. *Biochem Biophys Acta* 1699 :35-44
- Zhu M, Ma J, Parrington J, Calcra PJ, Galione A, Evans AM, (2009) Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question. *Am J Physiol Cell Physiol*. 298: C430–C441

## Tables

**Table 1 : Primers used in qPCR**

Genes	Primers sequence 5'-3'
Sulphide-oxidizing symbiont 16S (SOX)	For 5'-GAGTAACGCGTAGGAATCTGC-3' Rev: 5'-CGAAGGTCCTCCACTTTACTCCATAGAG-3'
Methanotrophic symbiont 16S (MOX)	For 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' Rev 5'-GCTCCGCCACTAAGCCTATAAATAGACC-3'
Cytosolic malate dehydrogenase (host) (MDH)	For: 5'- ATGGAGGAAAGAGATATGGCACTGAGCGT-3' Rev: 5'-TAACATTAAACATAGCCTAGGAACCTAATG-3'

Table 2. Down- and up-regulated proteins in the SOX/MOX- individuals.

Spot No	Identification	MW (kDa)		pI		Accession number <sup>c</sup>	Abundance SOX/MOX- /SOX/MOX+
		Exp <sup>a</sup>	Theor <sup>b</sup>	Exp <sup>a</sup>	Theor <sup>b</sup>		
1	$\alpha$ Tubulin	45	50.1	5.3	4.95	LocusA688	5.5
2	Gelsolin	45	37.1	5.6	8.38	Contig12697	0.2
3	Protein disulfide isomerase	50	21.2	6	5.26	Contig43893	20
4	Pno1	60	34.5	6.3	9.0	c4715	6.5
5	Two pore channel protein	30	19.5	6	6.44	read2lrc41159	0.12
6	Cathepsin Z precursor	25	42.9	6	8.29	read2c48440	6.1
7	14-3-3 protein	30	29.6	4.8	4.95	read2c10281	nd
8	$\beta$ Tubulin	40	40.9	5.1	5.2	read2c22713	4

Spot number refers to figure 2.

a : experimental molecular weight (MW) and pI deduced from 2DE gels; b: theoretical MW and pI from amino acid sequence c: Accession number from the *Bathymodiolus azoricus* translated EST database MW : molecular weight ; pI: Isoelectric point

Abundance (SOX/MOX-)/(SOX/MOX+) correspond to the ratio of spot volumes. *nd* protein is not present in SOX/MOX- condition.

Table 3. Up-regulated proteins under experimental symbiont loss conditions.

Spot No	Identification	MW (kDa)		pI		Accession number <sup>c</sup>	Abundance Experimental/ (SOX/MOX-/+)
		Exp <sup>a</sup>	Theor <sup>b</sup>	Exp <sup>a</sup>	Theor <sup>b</sup>		
7	Gα protein	30	37.3	6	4.95	Contig1120	4.5
9	Tropomyosin 2	32	28.2	5	8.38	read2c5998	1.7
11	Erp 29	20.2	20.2	5.8	5.26	Contig14798	2.2
13	Prohibitin	32	41.6	6	9.0	read2c5395	1.6
14	Electron-transfer flavoprotein	30	38.7	6.3	6.39	Rlrc73137	6.3
16	VDAC	30	25.7	6.5	5.38	read2lrc65295	2.8
33	Countin 2	25	22.3	4.9	4.59	c3042	1.1

Spot number refers to figure 3.

a : experimental molecular weight (MW) and pI deduced from 2DE gels; b: theoretical MW and pI from amino acid sequence c: Accession number from the *Bathymodiolus azoricus* translated EST database MW : molecular weight ; pI: Isoelectric point, Abundance Experimental/(SOX/MOX+/-) corresponds to the ratio of spot volumes.

Table 4. Down-regulated proteins under experimental symbiont loss conditions

Spot No	Identification	MW (kDa)		pI		Accession number <sup>c</sup>	Abundance Experimental/ (SOX/MOX <sub>-/+</sub> )
		Exp <sup>a</sup>	Theor <sup>b</sup>	Exp <sup>a</sup>	Theor <sup>b</sup>		
1	Hypothetical protein	60	65	6	5.76	LocusC35948	nd
3	Copin 3	50	60	5.5	5.52	Contig28271	nd
4	mitochondrial ATP synthase	33	35	4.5	9.16	Contig7299	nd
5	Phosphoglycerate kinase 2	24	27.3	6.5	7.6	Contig28436	nd
6	$\beta$ Tubulin	30	40.9	6	5.2	read2c22713	nd
8	Cathepsin Z	30	42.5	5.5	7.29	Rc41355	0.24
10	Hypothetical protein	32	48	6.5	9	read2c172	nd
12	Cytosolic malate dehydrogenase	32	43.8	6.5	8.34	read2lrc54000	nd
15	LRR domain protein	25	0.9	4.5	9	LocusB166923	nd
17	50S ribosomal protein	30	24.6	5	5.59	read2c54677	nd
18	Hsp70	35	20	4.5	9	Contig6590	nd
19	Gluthatione-s-transferase 2	20	30.9	6	8.86	Contig20862	nd
20	TCTP	15	21.9	4.5	4.81		nd
21	LRR domain protein	15	0.9	5	9	Contig47262	0.22
22	Histone 2A	12	29.3	5.5	9.2	nInc69938	nd
23	Cytochrome c oxydase VB	15	22.8	5	9	read2lrc30076	nd
24	Cold shock DNA binding protein	15	11	4.5	4.67	Contig7547	nd
25	Hypothetical protein	22	24.8	4	4.74	LocusD15663	nd
26	SMU1	32	38	5	9.25	Contig6343	nd
27	ATP synthase $\beta$ subunit	41	49	4.5	5.04	read2lrc38156	nd
28	ATP synthase $\alpha$ subunit	35	26	4.5	5.21	ROSC6YE18	nd
29	Hypothetical protein	30	24.8	5	9	LocusB12494	nd
30	Thioredoxin	15	23	5.5	6.47	Contig6638	0.175
31	Hsc70	40	23	4.5	4.74	LocusB159286	nd
32	$\alpha$ Tubulin	42	43.9	5	5.85	LocusA688	nd



Spot number refers to figure 3

a : experimental molecular weight (MW) and pI deduced from 2DE gels; b: theoretical MW and pI from amino acid sequence c: Accession number from the *Bathymodiolus azoricus* translated EST database MW : molecular weight ; pI: Isoelectric point, Abundance Experimental/(SOX/MOX+/-) corresponds to the ratio of spot volumes; *nd* protein is not present in experimental condition

Table 5. Proteins involved in stress response rather than specific to the loss of symbionts

Spot No	Identification
6/32	$\alpha$ and $\beta$ Tubulin
8	Cathepsin Z
9	Tropomyosine2
12	Cytosolic Malate dehydrogenase c
18	Hsp70
19	Gluthatione-s-transferase (GSH)
24	Cold shock DNA binding protein
31	Hsc70

## Figures

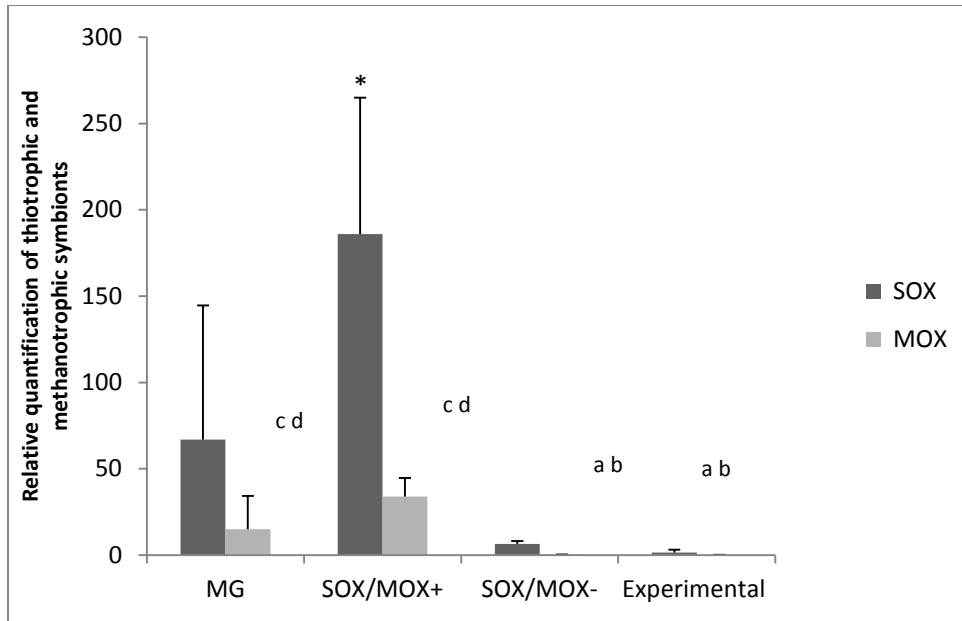


Figure 1. Relative quantification of thiotrophic (SOX) and methanotrophic (MOX) symbiont contents in gills of *B. azoricus* from Menez Gwen. MG corresponds to natural population (n=33), SOX/MOX+ to individuals with a high charge of symbionts in the natural population (n=6), SOX/MOX- to individuals with a low symbiotic charge (n=6) and *experimental* corresponds to the experimentally induced loss of symbionts. \*: significantly different from all other conditions for SOX contents ( $p < 0.05$  Kruskal-Wallis test). a, b, c, d significantly different from other conditions tested for MOX contents ( $p < 0.05$  Kruskal-Wallis test).

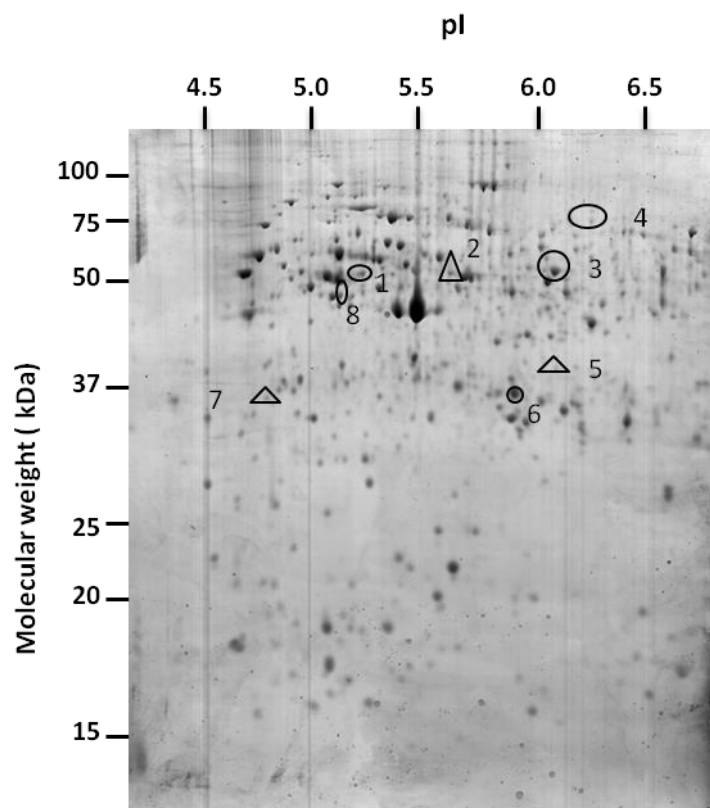


Figure 2. Representative 2-D gel of gills soluble proteins of *B. azoricus* in SOX/MOX-condition. Significantly differentially abundant spots are highlighted with the number of the spot. Down-regulated and up-regulated proteins are represented with triangles and circles, respectively.

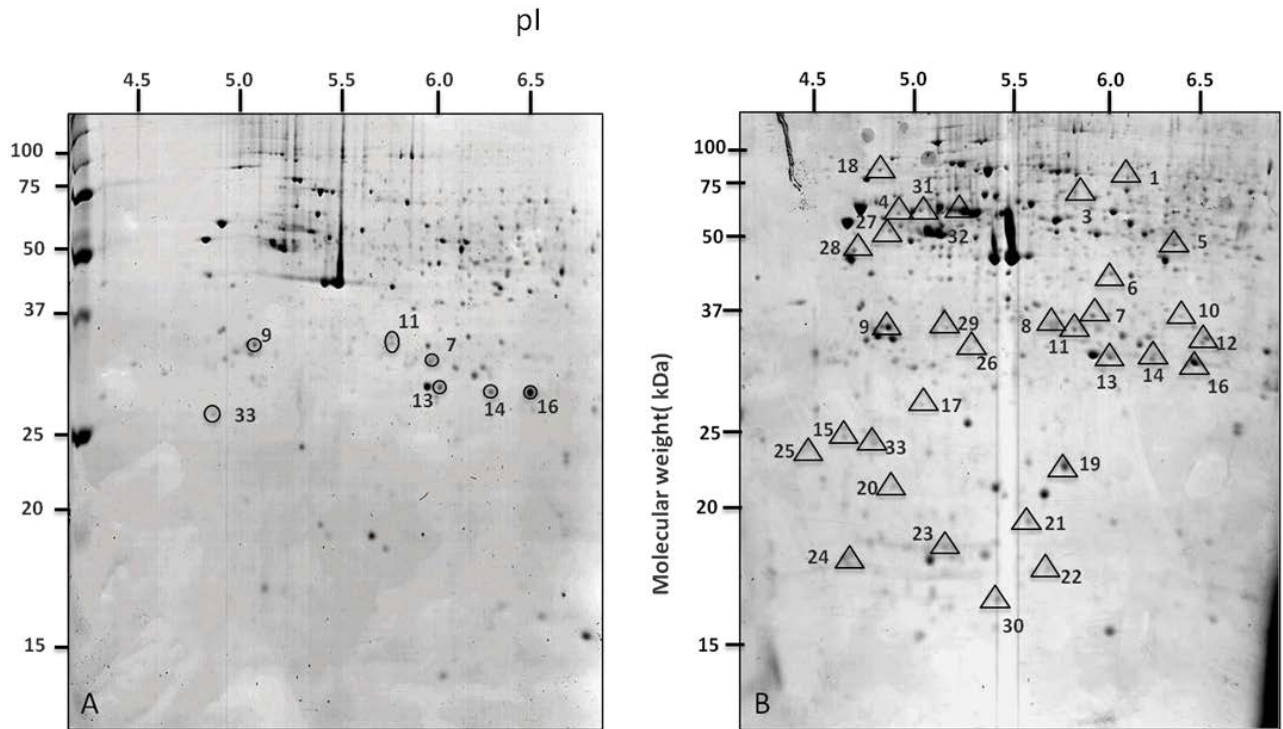


Figure 3. Representative 2D gel of gills soluble proteins of *B. azoricus* in SOX/MOX+/- condition (B) and experimental loss of symbionts (A). Significantly differentially abundant spots are highlighted with the number of the spot. Down-regulated and up-regulated proteins are represented with triangles and circles, respectively (n=6 gels/condition).

## Chapitre III

### **A la recherche d'acteurs moléculaires de la symbiose chez *B.azoricus*, une approche globale**

Ce chapitre correspond aux résultats d'une approche exploratoire menée à la fois à l'échelle protéomique et transcriptomique ayant pour but d'identifier des acteurs potentiels de la symbiose chez *B. azoricus*. Ces analyses ont été menées sur des individus issus de population naturelle ainsi que sur des organismes ayant perdu, maintenu, ou réacquis des symbiotes selon le protocole expérimental développé ci-dessous.

#### **1. Protocole expérimental**

Les modioles utilisées pour mes travaux de thèse sont issues d'un échantillonnage effectué durant les campagnes BioBaz et MomarSAT en juillet/août 2013. Ces campagnes ont eu lieu sur la dorsale médio-atlantique au niveau de la triple jonction des Açores sur les sites Menez Gwen, Lucky Strike et Rainbow. L'échantillonnage a été réalisé sur le fond grâce au robot sous-marin téléopéré Victor 6000 et les échantillons ont été ramenés et disséqués à bord du navire océanographique Pourquoi pas ?. Les prélèvements de *B. azoricus* pour mes travaux ont eu lieu sur le champ hydrothermal Lucky Strike (-1700m) au site appelé Montségur (37° 17, 286' N 32° 16, 530' W) (Figure 3.1).

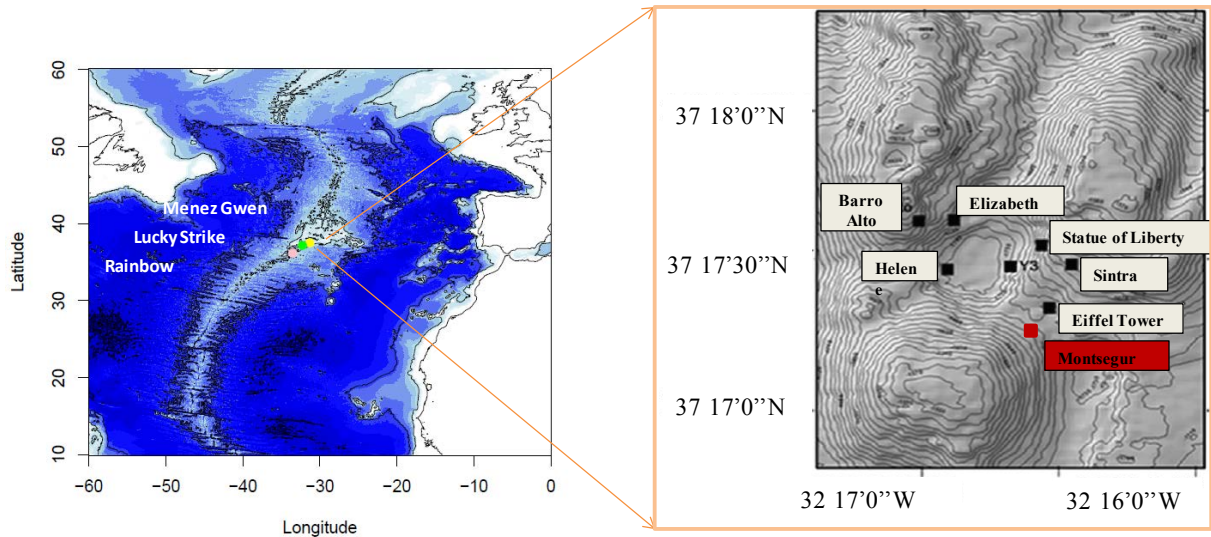


Figure 3.1 : Carte de la dorsale Médio-Atlantique (MAR) et zoom sur les principaux sites de Lucky Strike dont le site d'échantillonnage Montségur. En jaune: Menez Gwen, en vert: Lucky Strike, en rose: Rainbow (R, Marmap)

L'échantillonnage a consisté tout d'abord, au temps T0, en un prélèvement d'individus issus d'une population naturelle correspondant au groupe contrôle. A T0, une cinétique d'expérimentation *in situ* a également été mise en place. Ces expériences ont eu pour but d'induire une perte puis une ré-acquisition des symbiotes chez les moules.

Ainsi à T0, 5 cages ont été remplies avec une trentaine de moules de la population naturelle de Montségur, Lucky Strike. Ces cinq cages ont été éloignées d'une dizaine de mètres de la moulière, lieu de vie de la population naturelle, proche de la cheminée où les moules prospèrent, et déposées sur le basalte (Figure 3.2). Les moules se trouvent ainsi éloignées du fluide hydrothermal contenant les composés réduits (essentiellement  $H_2S$  à Montségur) principale source trophique de leurs symbiotes.

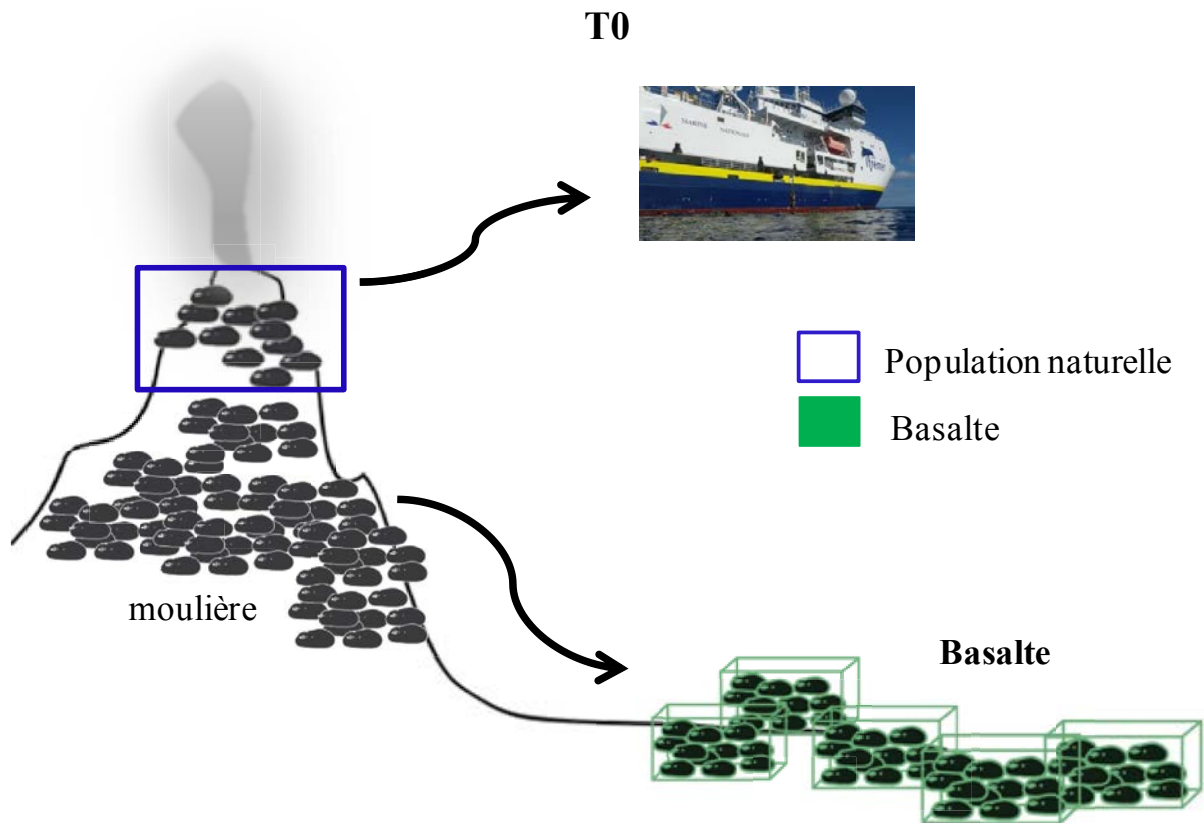


Figure 3.2: Echantillonnage de la population naturelle et dépôt de cinq cages contenant une vingtaine de moules, loin du fluide, sur le basalte (T0)

Après 6 jours (T1) sur le basalte une cage a été remontée, les moules ont été disséquées et leur branchies congelés dans l'azote liquide. Cette condition sera appelée Basalte T1 ou BT1. Parallèlement au prélèvement de cette cage toujours au temps T1, deux autres cages ont été déplacées du basalte vers la moulière. Ces deux cages revenues sur moulière seront appelées les transloquées (TR1.x) et ont pour but d'observer une ré-acquisition éventuelle des symbiotes (Figure 3.3).

Au temps T2, après 20 jours sur le basalte, une cage parmi celles présentes sur le basalte, et une cage transloquée ont été remontées, elles correspondent respectivement aux conditions basalte T2 (BT2), et tranloquée TR1.2.

Le même scénario a été réalisé après 27 jours (T3), les cages récupérées correspondant aux conditions basalte T3 (BT3) et tranloquée TR1.3.

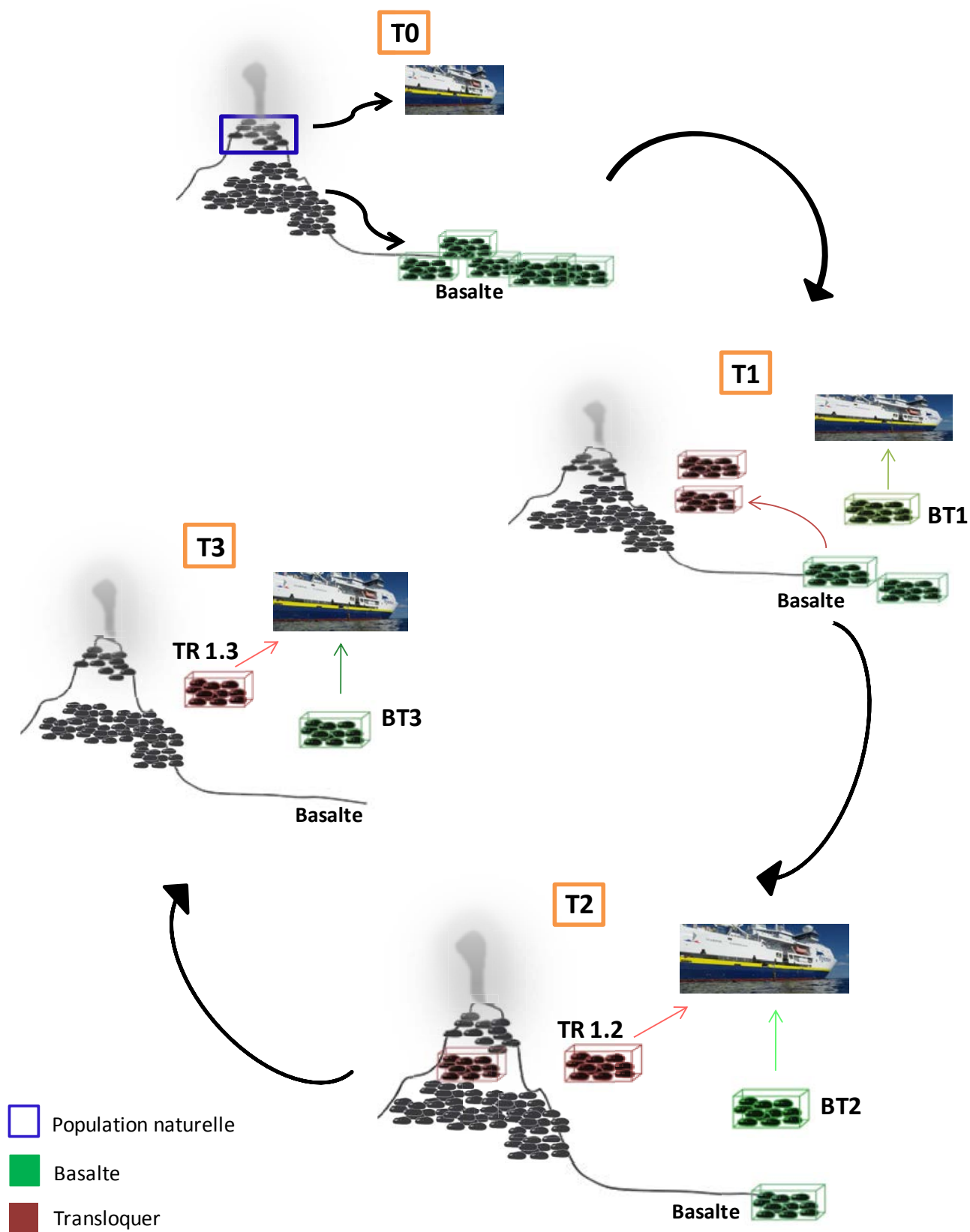


Figure 3.3: Design des expérimentations *in situ* aux temps T0, T1, T2 et T3.



## 2. Mesure de la charge et de l'activité symbiotique

### 2.1. Matériels et méthodes

#### 2.1.1. Extraction d'ADN et détermination du contenu symbiotique par qPCR

L'ADN des bactéries et symbiotes a été extrait des branchies selon la méthode de CTAB (CetylTrimethylAmmoniumBromide) (2% CTAB, 1% PVP, 1.4 M NaCl, 0.2% mercaptoethanol, 100 mM Tris HCl pH8, 0.1mg. mL<sup>-1</sup> protéinase K, 1 mg.mL<sup>-1</sup> lysozyme).

Un morceau de tissu branchial a été placé dans un tube Eppendorf contenant 600 µl de tampon. Les tissus ont été incubés en présence de 5µl de lysozyme et 2µl de protéinase K durant 2h à 60°C. Les ARNs présents dans le tube ont été dégradés *via* l'ajout de 1µL de RNase A (37°C/30min). L'ADN a été séparé des débris cellulaires par l'ajout de 600 µl de chloroforme/alcool isoamylique (24:1) et, après homogénéisation, centrifugé à 12500g/10min/4°C. Le surnageant est récupéré et l'ADN est mis à précipiter pendant la nuit à -20°C dans de l'éthanol 100%. Le culot d'ADN est récupéré dès le lendemain, centrifugé (12500rpm/15min/4°C) et lavé à l'éthanol 75% avant d'être centrifugé de nouveau (7500g /3min/4°C) et séché au SpeedVac. Le culot est ensuite resuspendu dans 150µl d'eau MilliQ stérile. Suite à cette extraction, l'ADN est quantifié, et la bonne qualité de celui-ci est vérifiée par spectrométrie Nanodrop (Nanodrop Technologies, Delaware, USA).

La quantité relative de symbiotes SOX et MOX est estimée par PCR quantitative selon le protocole de Boutet et collaborateurs (2011) avec des amorces spécifiques codant pour la sous-unité ribosomal 16S des bactéries symbiotiques SOX et MOX (Boutet et al., 2011; Duperron et al., 2006). Les amplifications ont été réalisées à l'aide du 2× Lightcycler®480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Mannheim Germany). Les réactions ont été réalisées en plaque thermo-fast® 384 PCR blanche dans un volume total de 5 µl contenant 70 nM de chaque amorce et 2,1 µl d'ADN dilué (correspondant à 2 ng d'ADN). Le programme d'amplification consiste dans un premier temps en une dénaturation initiale de l'ADN et activation de l'enzyme durant 15 min à 95°C, suivie de 40 cycles correspondant à une dénaturation à 95°C pendant 15 s, suivi d'une hybridation et d'une élongation à 60 °C pendant 1 min. Un fragment de 120 bp correspondant au gène codant pour la malate déshydrogénase cytosolique (cMDH) de *B. azoricus* est utilisé comme contrôle interne de PCR (Tableau 3.1). La quantité relative de chaque type de symbiote est estimée en utilisant la méthode comparative des Ct, en utilisant la formule  $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ , ( $\Delta Ct = Ct_{16S} - Ct_{MDH}$ ).

Tableau 3.1 : Tableau des amorces utilisées pour mesurer la charge symbiotique

Gènes	sequence 5'-3'
ARNr 16S SOX	F : 5'-GAGTAACGCGTAGGAATCTGC-3' R : 5'-CGAAGGTCCTCCACTTTACTCCATAGAG-3'
ARNr 16S MOX	F: 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' R: 5'-GCTCCGCCACTAAGCCTATAAATAGACC-3'
Malate déshydrogénase cytosolique	For: 5'- ATGGAGGAAAGAGATATGGCACTGAGCGT-3' Rev: 5'-TAACATTAAACATAGCCTAGGAACCTAATG-3'

### 2.1.2. Mesure de l'activité des symbiotes

#### -Extraction d'ARNs

Afin d'extraire l'ARN des branchies de *B. azoricus*, des morceaux de branchies ont été placés dans des tubes Eppendorf contenant 600µl de TRIZOL et des billes magnétiques, et broyés dans un broyeur à bille. S'ensuit une phase de séparation *via* l'ajout de 200µl de chloroforme afin d'obtenir une fraction supérieure contenant les ARNs et une fraction inférieure contenant les ADNs, protéines et lipides. Après homogénéisation, les tubes sont centrifugés (12000g/10min/4°C). et la phase supérieure contenant les ARNs est récupérée. Les ARNs sont ensuite précipités dans l'éthanol 100% à -20°C pendant la nuit. Après centrifugation, (12000g/15min/4°C), les culots obtenus sont lavés à l'éthanol 70% avant d'être séchés sous vide et mis en suspension dans 400 µl d'eau MilliQ stérile. Une seconde précipitation des ARNs est menée pendant la nuit à -20°C en ajoutant 40µl d'acétate d'ammonium 7M et 1mL d'éthanol 100%. Les culots d'ARNs sont récupérés par centrifugation (12000g/15min/4°C), lavés à l'éthanol 70% avant d'être séchés sous vide et resuspendus dans 200 µl d'eau MilliQ stérile. La concentration et la qualité des ARN sont déterminées par spectrophotométrie à l'aide d'un Nanodrop (Nanodrop Technologies, Delaware, USA).

#### - Reverse transcription

A partir de 2µg d'ARNs totaux extraits précédemment, on ajoute 2µL d'oligodT qui s'hybrideront aux queues polyA et 0.5µL de « random primers » qui s'hybrideront de façon aléatoire sur les ARNms. Le mélange est placé 10min à 55°C. Puis le mix réactionnel (5µL de

Buffer 5X promega/2µL de dNTP/1µL DTT (20mM)/1µL Reverse transcriptase promega) est ajouté au mélange précédent et placé à 37°C durant 1h.

- PCR quantitative

Les différents couples d'amorces ont été testés et sélectionnés pour leur efficacité à partir d'un pool d'ADNc de 8 individus dilué au 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400. L'amplification est faite à partir d'ADNc dilués au 1/200<sup>ème</sup> et les produits d'amplification ont une taille qui varie entre 150 et 350 pb. Les amplifications ont été réalisées à l'aide du 2× Lightcycler®480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Mannheim Germany) en plaque thermo-fast® 384 PCR blanche. Les volumes d'ARNs, d'amorces et de mix utilisés ainsi que le programme sont identiques à ceux utilisés pour mesurer la charge symbiotique. Un fragment du gène de la sous unité ribosomale 16 S est utilisé comme standard interne, et les gènes utilisés pour attester de l'activité des symbiotes SOX sont l'ATP sulfurylase et l'HupL (Tableau 3.2).

Tableau 3.2: Séquence des primers

Genes	Séquence de l'amorce (5'-3')
ARNr16S SOX	For 5'-GAGTAACGCGTAGGAATCTGC-3' Rev:5'-CGAAGGTCCTCCACTTTACTCCATAGAG-3'
ATP sulfurylase	For: 5'- GTGCGTGATGCCGCTATCCGCACCATG-3' Rev: 5'-GGTCCGGCATAGAGCATGTCAAACGGATA -3'
HupL	For : 5'-ACAAGTCTACCGATCAATTGC-3' Rev : 5'-CCATGAATATTTAGCACTTTC-3'

### 2.1.3. Analyses statistiques

La significativité des analyses issues des expériences de PCR quantitatives a été testée *via* le test de Kruskal-Wallis GraphPad Prism, USA ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) suivi d'un post test multi-comparaison de Dunn's.

## 2.2. Résultats

La quantification des symbiotes de types SOX et MOX a été mesurée par qPCR sur les individus issus de la population naturelle et des expérimentations *in situ* basalte (BT1, BT2, et BT3) et transloqués (TR1.2, TR1.3) afin de valider notre hypothèse de la perte, du maintien ou de la ré-acquisition des symbiotes. Les symbiotes de types MOX étant très peu abondants (<10U) dans les branchies de la population naturelle, due aux faibles concentrations en méthane sur les différents sites de Lucky Strike (Charlou et al., 2000), nous nous sommes focalisés sur les symbiotes de types SOX.

Le test statistique de Kruskal-Wallis ne montre pas de différence significative entre les individus issus de la population naturelle et ceux issus de la condition basalte T1 (BT1) en terme de charge symbiotique (Fig 3.4). Cette diminution de la charge symbiotique devient significative après 20 jours (BT2) et 27 jours (BT3) sur le basalte, comparativement aux individus de la population naturelle et de BT1. Cependant aucune différence significative n'a été observée entre les individus issus des expérimentations de translocation (TR1.2 et TR1.3) et ceux remontés après 6 jours sur le basalte (BT1). Ainsi, les individus isolés du fluide et mis sur le basalte présentent une diminution légère de leur charge symbiotique dès 6 jours, et cette diminution devient significative après 20 jours sur le basalte. Parallèlement, le retour sur site des individus transloqués semble induire un maintien de la charge symbiotique puisque celle-ci reste inchangée entre BT1, TR1.2 et TR1.3.

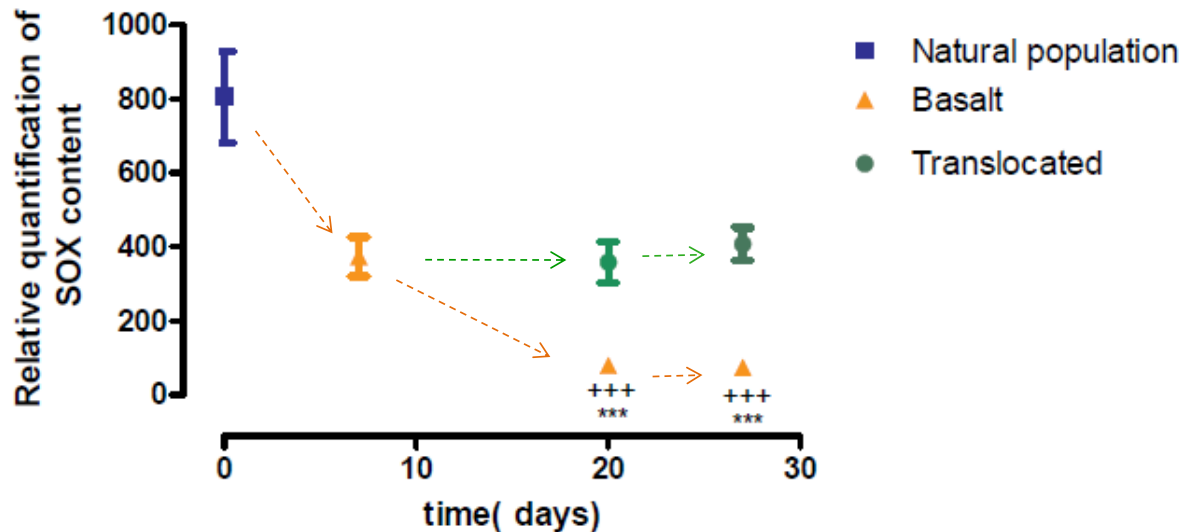


Figure 3.4: Quantification relative de la charge en bactéries SOX dans trois conditions expérimentales : Population naturelle (bleu foncé), BT1, BT2 et BT3 (orange) et TR1.2, TR1.3 (vert). \*: significativement différents de la population naturelle, +: significativement différent de BT1. (\* ou +:  $p < 0.05$ , \*\* ou ++  $p < 0.001$ , \*\*\* ou +++  $p < 0.0001$ ). (test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunns).

Cette diminution de la charge symbiotique chez les individus sur le basalte nous a amené à nous interroger sur l'état physiologique des symbiotes présents notamment dans les conditions BT2 et BT3. Sont-ils toujours vivants, et quel est l'état de leur métabolisme ? Afin de répondre à cette question, nous nous sommes intéressés à deux enzymes clés du métabolisme des bactéries SOX, l'ATP sulfurylase et l'HupL. L'ATP sulfurylase est une des trois enzymes principales de la voie d'utilisation du sulfure, mise en œuvre par les bactéries SOX pour produire de l'ATP et des électrons (Krämer & Cypionka 1989). Au contraire, HupL est une hydrogénase impliquée dans l'oxydation du  $H_2$ . En effet les bactéries de types SOX sont à la fois capables d'oxyder l' $H_2S$  et l' $H_2$  pour synthétiser de l'ATP (Petersen et al., 2011). Dans la figure 3.5A, nous pouvons observer que l'activité ATP sulfurylase augmente avec le temps passé sur le basalte alors que cette activité a tendance à diminuer après 20 jours de retour sur le site (Figure 3.5 B). Une tendance identique est observée pour l'hydrogénase HupL en conditions basalte avec une augmentation de l'expression relative de cette dernière en fonction du temps que les individus ont passés éloignés de la moulière (Figure 3.5 C). Cependant le profil d'expression de HupL après un retour sur site est différent de celui de l'ATP sulfurylase. En effet, la translocation n'a pas d'effet significatif (une légère diminution de l'expression est tout de même observable) sur l'expression de HupL au temps TR1.2, par

contre nous observons une augmentation significative de cette expression à TR1.3 (Figure 3.5 D).

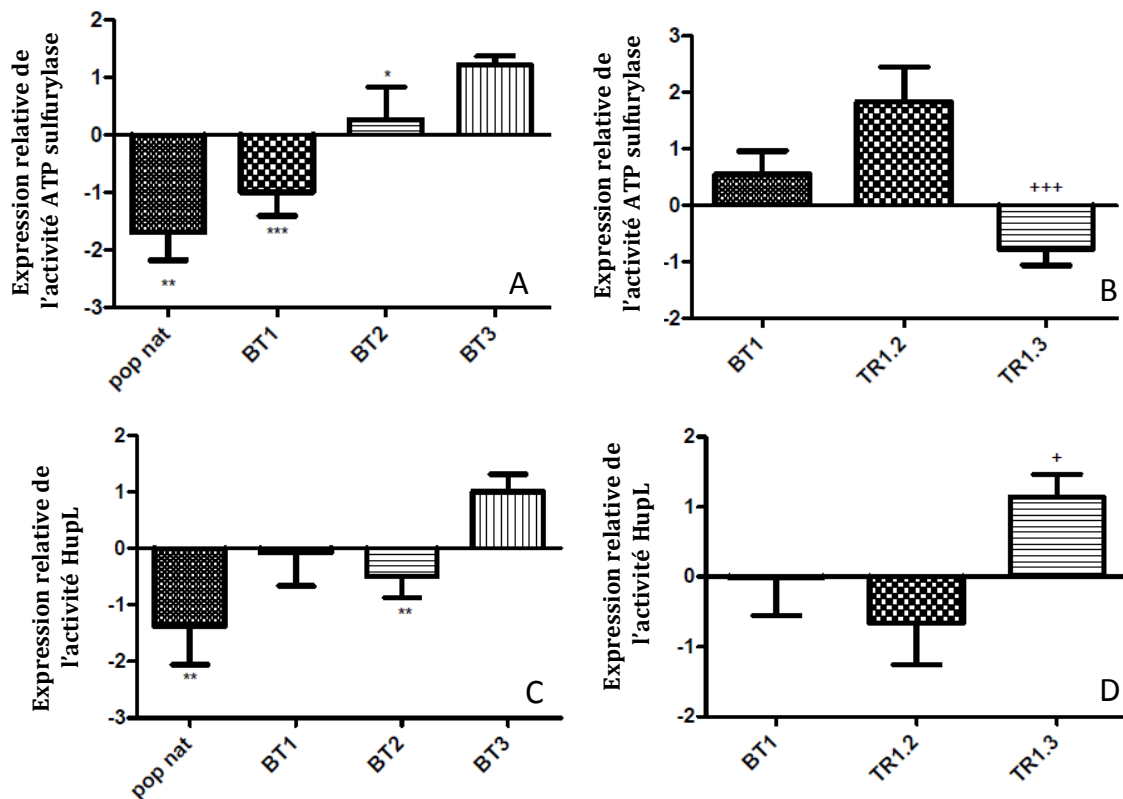


Figure 3.5 :Expression relative de l'activité ATP sulfurylase et HupL chez les symbiontes SOX. A et B représentent l'expression relative de l'ATP sulfurylase dans les conditions basale (A) et transloqués (B) tandis que C et D correspondent à l'expression relative de HupL dans les conditions basale (C) et transloqués (D). \*: significativement différent de BT3 et+: significativement différent de TR1.2. (\*ou +:  $p < 0.05$ , \*\* ou ++ $p < 0.001$ , \*\*\* ou +++ $p < 0.0001$ ). (test de Kruskal-Wallis et post-test de Dunns).

Ainsi, ces résultats montrent une diminution significative de la charge symbiotique en bactéries SOX après 20 et 27 jours passés sur le basalte, corrélés à une augmentation des activités HupL et ATP sulfurylase. Cela suggère une efficacité d'oxydation de l' $H_2S$  et  $H_2$  plus importante malgré une quantité de symbiotes plus faible. Parallèlement les organismes éloignés du basalte et remis sur site (TR1.2 et TR1.3) montrent peu ou pas de différence en termes de charge avec les organismes remontés à BT1, suggérant un maintien de leur charge symbiotique. Dans ces conditions on observe une réponse opposée des enzymes ATP sulfurylase et HupL.

Après nous être assurés que les expérimentations *in situ* avaient bien mené à la perte ou au maintien de la charge symbiotique, nous nous sommes intéressés à l'impact de ces deux

mécanismes sur le protéome et le transcriptome de l'hôte. En effet, bien que de nombreuses études sur la symbiose chez *B. azoricus* aient été menées, les acteurs moléculaires de celle-ci restent très peu connus et les mécanismes permettant la reconnaissance, le maintien et/ou la régulation des symbiotes restent largement incompris. Dans la partie qui suit (III.3) nous décrirons les résultats obtenus suite à l'étude du protéome branchial de *B. azoricus* dans les différentes conditions *in situ*. La partie suivante (III.4) sera consacrée aux résultats de l'étude transcriptomique.

### **3. Approche protéomique**

#### **3.1. Protocole expérimental**

##### **3.1.1. Extraction des protéines et séparation**

Les branchies conservées à -80°C sont broyées dans l'azote liquide. Le broyat est repris dans 1mL d'un mélange TCA (10%)/2β-mercaptoéthanol (0.07%)/acétone glacé et placé à -40°C durant 3h. Puis les échantillons sont centrifugés (12500g/15min/4°C), le culot est récupéré et rincé dans un mélange 2β-mercaptoéthanol (0.07%)/acétone, et centrifugé de nouveau (12500g/15min/4°C). Après cela, le culot est séché à l'air libre durant 30min et remis en suspension dans un tampon d'échantillonnage (Urée 6M/Thiourée 2M/CHAPS 0.02%/DTT 65mM ampholytes–Bio-Lyte®, BioRad, Marnes-la-Coquette, France) et homogénéisé. Enfin, l'échantillon est centrifugé une dernière fois (10000g/10min/4°C). Le surnageant est récupéré et la concentration en protéines est mesurée selon les instructions du kit Bio-Rad Protein Assay (BioRad, Marnes-la-Coquette, France). Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire sur gel SDS-PAGE 12%. 75μg d'un pool de protéine totale correspondant à 10 individus par conditions sont déposés sur gel et séparés. Après migration les gels sont colorés 12h au Bleu de Coomassie. Après coloration chaque piste est découpée en une quinzaine de bandes (Figure 3.6).

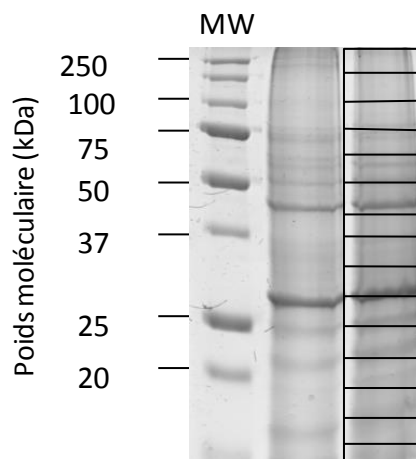


Figure 3.6 :Gel d'électrophorèse à une dimension du protéome branchiale de *B.azoricus*. Les grilles montrent la façon dont le gel a été découpé avant la digestion tryptique et les analyses de spectrométrie de masse. La partie gauche indique le poids moléculaire correspondant à la piste de marqueur de poids moléculaire (MW)

### 3.1.2. Digestion tryptique

La digestion tryptique « *in-gel* » a été menée comme décrit par Shevchenko en 2001. Brièvement, après une étape de réduction (DTT 10mM/ $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM/30min/56°C) et d'alkylation (Iodoacétamine 55mM/ $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM/20min dans le noir à température ambiante) les bouts de gels sont réhydratés dans une solution de trypsine (modified sequencing grade, Roche) (25mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ / 12.5ng. $\mu\text{L}^{-1}$  trypsine/4°C/45min). Après réhydratation, le tampon est éliminé et remplacé par un volume de tampon identique, mais ne contenant pas de trypsine. Les fragments de gels sont alors incubés toute la nuit à 37°C sous agitation. La réaction est stoppée par ajout d'acide formique (5%) puis les échantillons sont incubés dans de l'acétonitrile (100%) (15min/37°C) sous agitation douce. Enfin les échantillons sont séchés sous vide et soumis à ultrasons pendant 10min. Les échantillons sont ensuite repris dans une solution 0,1 % acide trifluoroacétique (TFA)/2 % acétonitrile, déssalés sur colonnes ZipTipC18® (C18 ZipTip®, Millipore, Billerica, MA, USA) et repris pour les analyses de nanoLC MS/MS dans du tampon (2%ACN/0.05%TFA).

### 3.1.3. Analyses MS/MS

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées à l'Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielle de Paris (ESPCI, CNRS USR 3149). Pour chaque analyse, 8 $\mu\text{l}$  de la



solution peptidique obtenue précédemment sont chargés sur une pré-colonne (C18 Acclaim PepMap 100 Å, 1mm id, 500mm de long, Dionex) et élué sur une colonne en phase inverse (nano C18 Acclaim PepMap100 Å, 75 µm \*50 cm de long, Dionex), à un flux constant de 220nL/min, avec un gradient allant de 2% à 50% de tampon B durant 170min suivie par un gradient de 50 à 60% de tampon A durant 10 min (Tampon A: eau/ACN/FA 98:2:0.1 (v/v/v); Tampon B eau/ACN/FA 10:90:0.1 (v/v/v)). Les analyses MS ont été faites sur un spectromètre de masse FT ICR (LTQ-FT Ultra, ThermoFisher Scientific, San Jose, CA) avec une méthode d'acquisition Top 7. Cette dernière consiste en une résolution MS de 60 000, un rapport m/z compris entre 500 et 2000 suivie de 7 acquisitions MS/MS (LTQ) sur les sept pics les plus intenses avec une exclusion dynamique de 90s. Les données brutes sont traitées avec Proteome Discover version 1.4 (ThermoFisher Scientific) et Mascot version 2.5 (Matrix Science). Chaque échantillon est analysé en triplicat. La recherche dans les bases de données a été effectuée sur des données fusionnées en utilisant l'outil de recherche de Mascot sur la banque d'EST de *B. azoricus* (Tanguy et al., 2008). Les paramètres suivants ont été utilisés : jusqu'à 2 miss-cleavage, MS tolerance 10 ppm, MS/MS tolerance 500mma, peptide tryptique entier, modifications partielles carbamidométhylation (C), oxydation (M). La validation des fichiers DAT a été accomplie en utilisant le logiciel MyproMS v3.1 (Poullet et al 2007). L'identification des protéines a été validée seulement si leur score était significatif ( $p > 0.05$ ), et si elles étaient identifiées avec au moins 2 peptides et avec un score supérieur à 25.

## 3.2. Résultats

Nous traiterons dans un premier temps de l'impact de la perte de symbiote sur le protéome branchial (conditions BT1, BT2 et BT3 vs PopNat) puis de celui du maintien lors des translocations (TR1.2 et TR1.3 vs BT1).

### 3.2.1. Impact de la perte des symbiotes sur le protéome branchial

Dans cette partie nous comparerons les protéomes d'individus issus de population naturelle avec des individus issus de la cinétique de perte symbiotique. Les comparaisons ont été effectuées une à une, à savoir que chaque temps de cinétique a été comparé à la population naturelle. Entre 800 et 1000 protéines ont été identifiées pour chaque condition (Figure 3.7). Notons que dans la condition BT2, le nombre de protéines identifiées est supérieur aux autres

conditions. La figure 3.7 ne représente que le nombre de protéines identifiées ayant une fonction connue. Pour chaque condition, une part non négligeable d'environ 200 protéines ont une fonction encore inconnue.

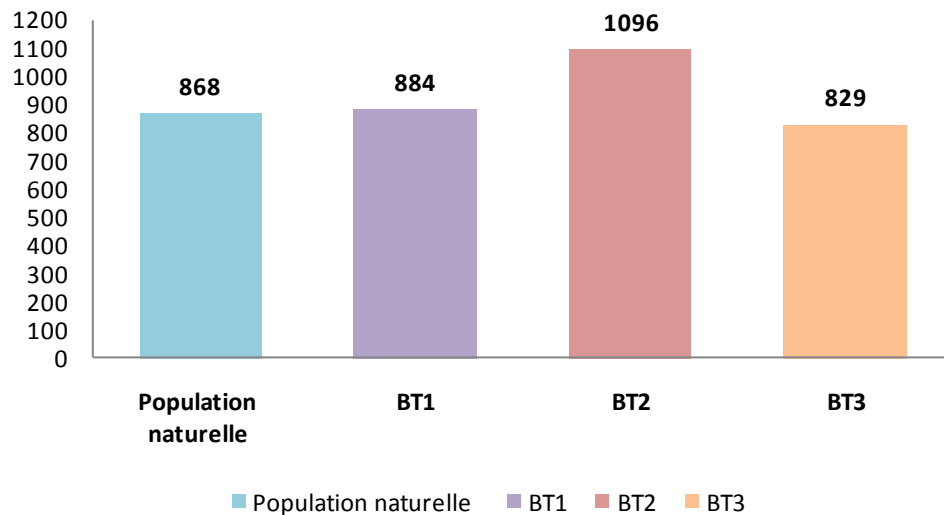


Figure 3.7 : Nombre de protéines identifiées dans la population naturelle en basalte T1 (BT1) basalte T2 (BT2) et basalte T3 (BT3)

Les 868 protéines identifiées dans la population naturelle ont été classées selon leur rôle biologique en utilisant l'annotation GO (Gene Ontology). La figure 3.8 montre qu'une partie importante des protéines identifiées sont impliquées dans des processus métaboliques, cellulaires (transcription, traduction, réparation de l'ADN,...) ou dans des processus de développement et de division cellulaire.

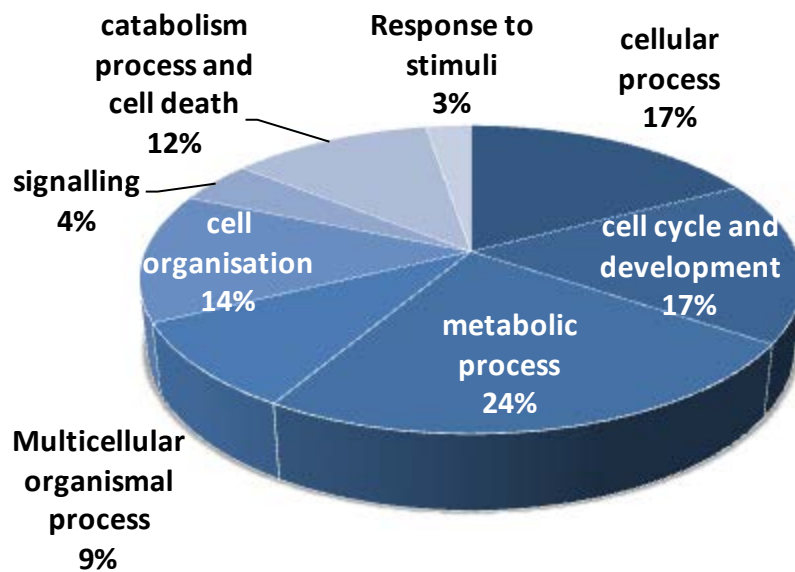


Figure 3.8 : Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines identifiées du protéome de *B. azoricus* issus de la population naturelle (Lucky Strike, Montségur)

A partir des données obtenues dans la population naturelle, nous avons comparé les protéines identifiées au sein de cette condition avec les protéines identifiées à chaque temps de cinétique de la perte symbiotique. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés aux rôles biologiques des protéines différentiellement exprimées en condition basale (BT1, BT2 ou BT3), puis nous nous sommes focalisés sur trois processus biologiques spécifiques : le métabolisme, l'immunité et l'apoptose. Ces trois processus ont été ciblés *a priori* car nous pouvons formuler l'hypothèse que la perte de symbiotes les impacterait. En effet, nous avons expliqué dans l'introduction de cette thèse que la symbiose chez *B. azoricus* a pour rôle principal l'accessibilité pour l'hôte au carbone inorganique et à une forme d'énergie permettant le bon fonctionnement de son métabolisme. Il est donc pertinent de se questionner sur les conséquences sur le métabolisme de l'hôte de la perte de symbiotes drastique observée en BT2 et BT3. *B. azoricus* est-il alors capable de maintenir une activité métabolique basale *via* son système digestif et son métabolisme hétérotrophe ?

Parallèlement, afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation des symbiotes au sein des branchies de l'hôte, nous nous sommes intéressés aux processus immunitaire et apoptotiques. Ces deux processus sont depuis quelques années très étudiés dans le contexte de la symbiose. En effet de nombreux acteurs de l'immunité (PGRPs, TLRs, PAMs) ont été

identifiés chez les mammifères et les invertébrés comme étant impliqués dans le maintien ou la régulation du microbiome (Chu and Mazmanian, 2013; Gross et al., 2009). De même, il est fréquent lors de la colonisation de l'hôte par son symbiote, c'est-à-dire lors de la mise en place de l'association symbiotique d'observer une morphogenèse de l'organe devant accueillir les symbiotes, morphogenèse impliquant des mécanismes d'apoptose. C'est le cas notamment chez les éponges symbiotiques ainsi que dans l'association *E. scolopes/V. fischeri* ou encore chez le ver siboglinidé *R. pachyptila* (Lee et al., 2001; Nussbaumer et al., 2006; Nyholm and McFall-Ngai, 2004). Chez ce dernier cependant, il semblerait qu'au-delà de la mise en place du trophosome, organe symbiotique de *Riftia*, les processus apoptotiques lui permettent de se débarrasser des cellules infectées par la bactérie symbiotique dans le reste de son organisme (Nussbaumer et al., 2006). Enfin, lors d'un stress important (température, UV...) chez les coraux symbiotiques, on peut observer "une cassure de la symbiose", c'est à dire une perte des dinoflagellés symbiotiques présents dans leur gastroderme. Cela induit ce qui est communément appelé le « blanchissement » des coraux. L'élimination des symbiotes du tissu de l'hôte fait appel entre autres aux mécanismes de l'apoptose, entraînant la mort des cellules symbiotiques de ce dernier (Login et al., 2011; Weis, 2008).

#### a. Impact de la perte de symbiotes sur les processus biologiques chez l'hôte, focus sur le métabolisme

Dans cette partie, l'accent est mis sur la comparaison entre les différents temps de cinétique et la population naturelle, tout d'abord sur le protéome branchial complet, puis axé sur le métabolisme principal de l'hôte.

Les termes de contrôle métabolique et régulation métabolique sont souvent utilisés lorsque l'on s'intéresse aux variations métaboliques chez un organisme. Cependant ces deux termes correspondent à des processus différents. La régulation métabolique correspond au processus de maintien des flux de métabolites, tandis que le contrôle métabolique correspond aux variations enzymatiques en réponse aux modifications extérieures, par exemple l'apport en nutriments pour alimenter le flux ou encore la sécrétion d'hormones (Voet & Voet 2005) (Kacser and Porteous, 1987). Dans cette partie nous nous focaliserons sur le contrôle métabolique, en explorant la régulation des différentes enzymes dans les principales voies métaboliques. Nous nous baserons sur les travaux de Kacser et Burns, suggérant que le contrôle d'une voie métabolique n'est pas régi par une enzyme clef, mais par les différentes enzymes constituant cette voie (Kacser & Burns 1973).

### **-BT1: Faible perte symbiotique**

Après 6 jours sur le basalte, nous avons pu observer une diminution de moitié de la charge symbiotique comparée à la population naturelle. La comparaison du protéome branchial entre ces deux conditions montre que 678 protéines sont communes et que 190 ont été identifiées seulement dans la population naturelle et 206 seulement en BT1 (Figure 3.9).

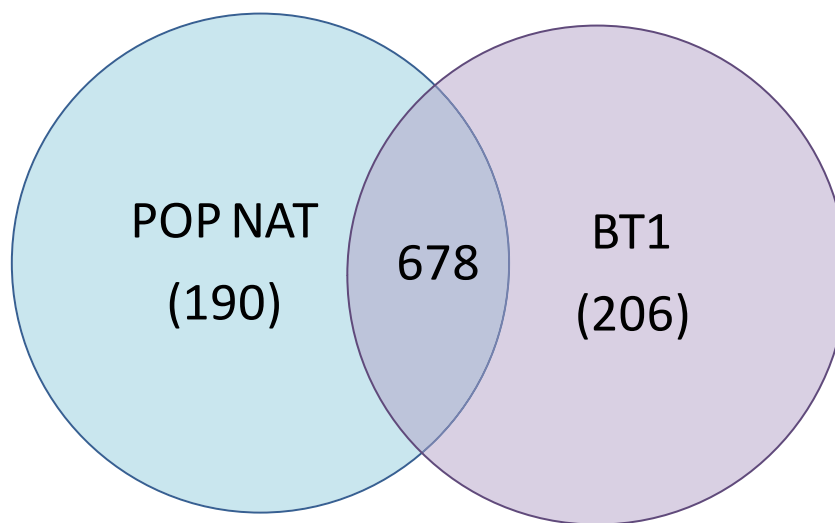


Figure 3.9 : Diagramme de Venn des protéines identifiées dans la condition population naturelle et BT1. A l'intersection des cercles se trouvent les protéines communes entre ces deux conditions, et le nombre inscrit au milieu de chaque cercle représentent les protéines présentes seulement dans cette condition.

POP NAT: population naturelle

Les protéines détectées en population naturelle et non détectées en BT1 seront dites « sous-exprimées en BT1 » et celles détectées en BT1 mais non détectées en population naturelle seront dites « surexprimées en BT1 ». En effet, il n'est pas possible de savoir si une protéine est absente ou seulement non détectable avec nos outils.

Les protéines surexprimées en BT1 ont été classées selon les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées *via* l'annotation GO (Figure 3.10).

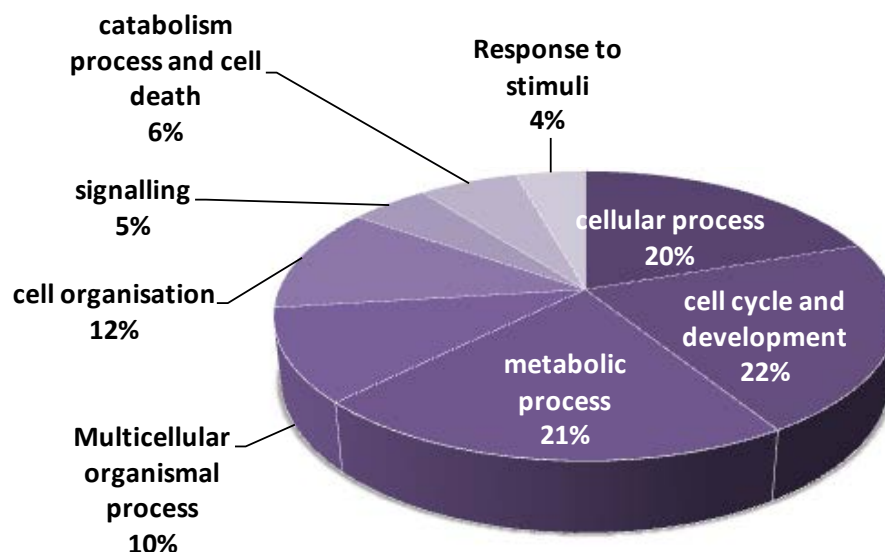


Figure 3.10 : Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines surexprimées dans la condition BT1 vis-à-vis de la population naturelle (Lucky Strike, Montségur)

Nous observons une répartition des protéines surexprimées similaire dans cette condition à la répartition globale observée dans la population naturelle avec plus de la moitié des protéines impliquées dans des processus cellulaires, métaboliques ou liées au développement/cycle cellulaire.

La Tableau 3.3 indique les protéines sur et sous-exprimées en condition BT1 et impliquées dans les voies métaboliques principales. De façon générale, nous observons une importante sous-expression de protéines impliquées dans les voies principales d'utilisation des sucres tels que la glycolyse et la voie des pentoses phosphates. Le cycle de Krebs ne semble pas très impacté car seule l'enzyme 2-oxoglutarate déshydrogénase est sous-exprimée. Cette dernière catalyse la réaction permettant la production de succinyl-CoA à partir de l' $\alpha$ -cétoglutarate. De plus, la  $\beta$ -oxydation des acides gras semble fortement diminuée, ce qui suggère que l'hôte n'utilise pas ou plus, après 6 jours, cette réserve d'énergie. Enfin, nous observons la sous-expression d'un nombre conséquent de protéines impliquées dans les complexes

mitochondriaux responsables du transport d'électron au cours de la phosphorylation oxydative dans la membrane de la mitochondrie et permettant *in fine* la production d'ATP.

Tableau 3.3 : Protéines impliquées dans le métabolisme général de *B. azoricus* qui sont sur ou sous-exprimées en condition BT1 comparé à la population naturelle.

	Surexprimé en BT1	Sous-exprimé en BT1
Glycolyse	/	-Phosphoglycerate kinase -Pyruvate Kinase
Voie des pentoses phosphates	- Deoxyribose Phosphate alodolase	- G6Phosphate deshydrogénase - Transaldolase - Transketotase like prot2
Cycle de Krebs	/	- 2-oxoglutarate deshydrogénase
Phosphorylation oxydative	/	- Succinate deshydrogénase - Cytochrome b-c1 complexe mitochondrial - Cytochrome c sous unité 6a - Protein sco1 mito
$\beta$ -oxydation des AG	/	- PropionylCoA - FA desaturase - HydroxyacylCoA deshydrogenase mitochondriale - Carnitine-o-palmitoyltransferase
Gluconéogenèse	- Pyruvate mitochondriale - Enzyme malique mitochondriale	

/: pas de protéine identifiée dans cette catégorie.

## -BT2: Diminution drastique de la charge symbiotique

Après 20 jours sur le basalte une diminution significative du nombre de symbiotes par rapport à la population naturelle et à BT1 est observable (Figure 3.4). La comparaison du protéome branchial entre la population naturelle et la condition BT2 montre que 743 protéines sont communes et que 125 ont été identifiées seulement dans la population naturelle et 353 seulement en BT2 (Figure 3.11).

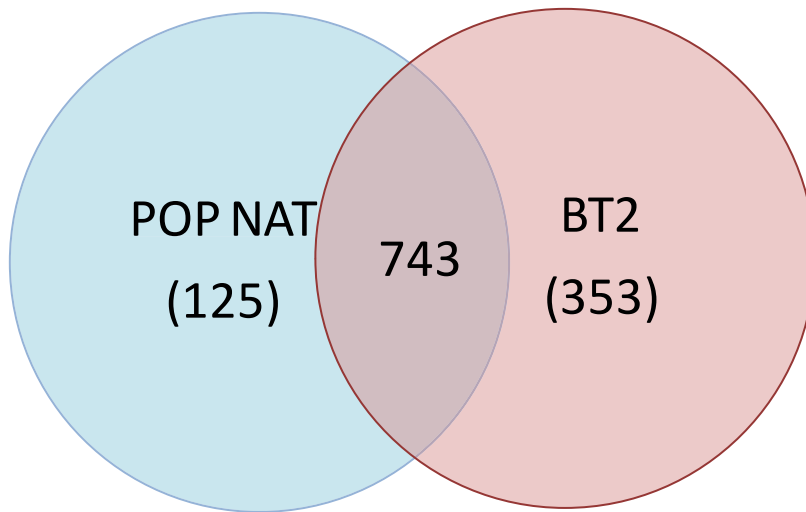


Figure 3.11 : Diagramme de Venn des protéines identifiées dans la condition population naturelle et BT2. A l'intersection des cercles se trouvent les protéines communes entre ces deux conditions, et le nombre inscrit au milieu de chaque cercle représentent les protéines présentes seulement dans cette condition.  
POP NAT: population naturelle

Les protéines surexprimées en BT2 ont été classées selon les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées *via* l'annotation GO (Figure 3.12). Nous observons cette fois-ci une part plus importante des protéines impliquées dans des processus métaboliques (29%), contre 21% en BT1, ainsi qu'une augmentation des protéines surexprimées impliquées dans l'organisation cellulaire (12% en BT1 et 22% en BT2), le catabolisme et l'apoptose (de 6% à 11%). Parallèlement, nous observons une diminution du nombre de protéines surexprimées impliquées dans le cycle cellulaire/développement ainsi que dans les processus associés aux organismes multicellulaires tels que la communication entre cellules.



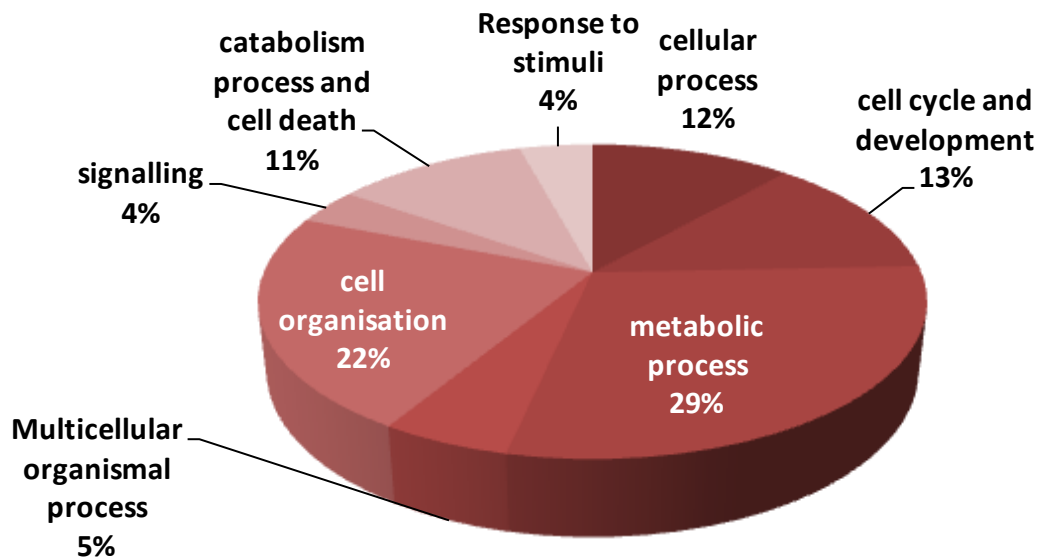


Figure3.12: Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines surexprimées dans la condition BT2 vis-à-vis de la population naturelle (Lucky Strike, Montségur)

Le tableau 3.4 indique les protéines du métabolisme principal impactées par une diminution drastique de la charge symbiotique. Contre toute attente, et contrairement à la condition BT1, nous observons que de nombreuses protéines impliquées dans l'utilisation des sucres sont surexprimées en BT2. En effet, trois enzymes de la glycolyse sont surexprimées, ainsi que 2 enzymes impliquées dans le cycle de Krebs et 2 autres impliquées dans la voie des pentoses phosphates. Ces dernières sont des enzymes de « shunt », c'est à dire qu'elles ne sont pas impliquées dans la voie principale. De plus, nous observons la surexpression de protéines impliquées dans la chaîne de transfert d'électrons. Nous n'avons pas observé dans cette condition de protéines sous-exprimées en relation avec le métabolisme, contrairement à la condition précédente, et aucune régulation n'a été observée dans la voie d'utilisation des acides gras. Par rapport à la population naturelle et à BT1, il semble que le métabolisme général soit activé en BT2.

Tableau 3.4 : Protéines impliquées dans le métabolisme général de *B.azoricus* sur ou sous-exprimées en condition BT2 comparé à la population naturelle.

	Surexprimé en BT2	Sous-exprimé en BT2
Glycolyse	-Phosphoglycerate kinase 1 -Aldolase -Probable pyruvate deshydrogenase	/
Voie des pentoses phosphates	-Oxidoreductase glyr1 homolog (shunt) -6-phosphogluconolactonase (shunt)	/
Cycle de Krebs	-Citrate synthase -Isocitrate deshydrogenase	/
Phosphorylation oxydative	-Cytochrome c oxidase polypeptide VI b -NADH-ubiquinone oxidoreductase	/

/ : pas de protéine identifiées dans cette categorie.

### -BT3: Charge symbiotique très faible

En BT3, la charge symbiotique est presque identique à BT2, et donc significativement différente de la population naturelle et de BT1. La comparaison du protéome branchial entre la population naturelle et la condition BT3 montre que 671 protéines sont communes et que 197 ont été identifiées seulement dans la population naturelle et 158 seulement en BT3 (Figure 3.13).

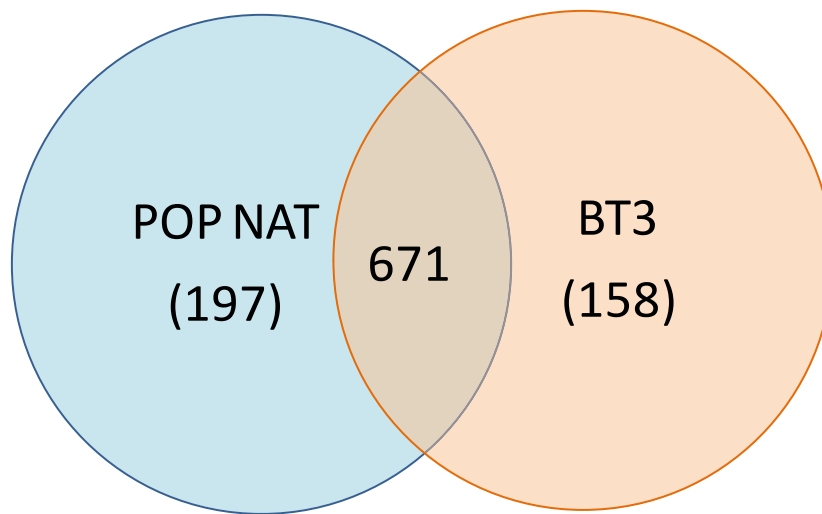


Figure 3.13 : Diagramme de Venn des protéines identifiées dans la condition population naturelle et BT3. A l'intersection des cercles se trouvent les protéines communes entre ces deux conditions, et le nombre inscrit au milieu de chaque cercle représentent les protéines présentes seulement dans cette condition.  
POP NAT: population naturelle

Comme précédemment, les protéines surexprimées en BT3 ont été classées selon les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées *via* l'annotation GO (Figure 3.14). Nous observons une répartition des protéines identifiées dans les différents processus tout à fait différente des autres conditions. Tout d'abord, malgré une charge symbiotique identique à BT2, on observe une diminution de la représentation de protéines impliquées dans le métabolisme (de 29% en BT2 à 19% en BT3), et une augmentation du nombre de protéines surexprimées en BT3 impliquées dans la réponse aux *stimuli* (4% en BT1 et BT2 contre 15% en BT3).

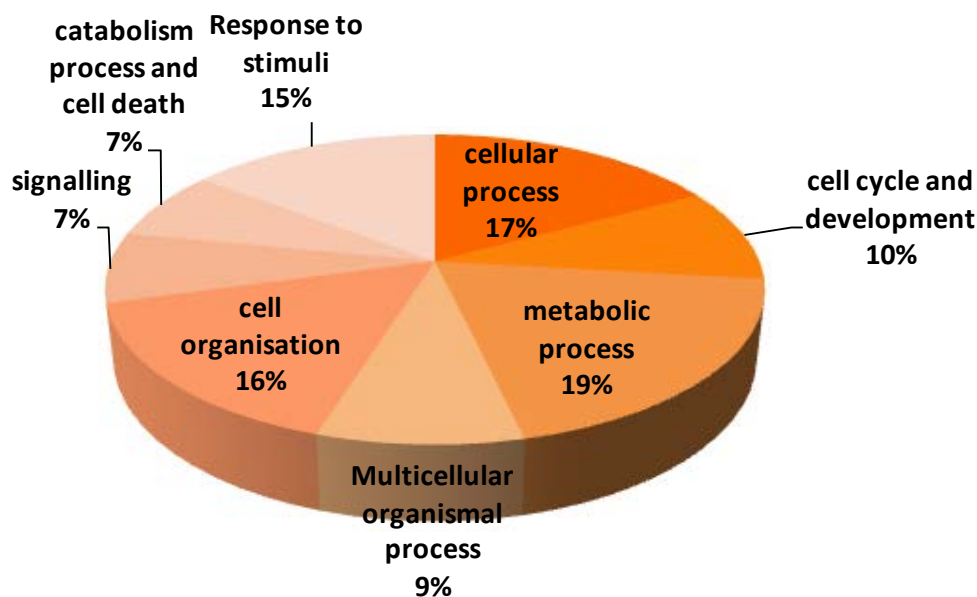


Figure 3.14 : Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines surexprimées dans la condition BT3 vis-à-vis de la population naturelle (Lucky Strike, Montségur)

Il semble que la réponse métabolique des individus issus des conditions BT2 et BT3 diffère également. En effet, nous observons en BT3 (Tableau 3.5), une sous-expression de protéines impliquées dans la majorité des voies métaboliques principales. La glycolyse ne semble pas être affectée puisque deux enzymes importantes de cette voie sont surexprimées. Le cycle de Krebs, qui était jusque là non impacté par la perte de symbiotes, semble fonctionner au ralenti puisque 4 enzymes principales sont sous-exprimées et il en est de même pour la  $\beta$ -oxydation des acides gras.

Tableau 3.5 : Protéines impliquées dans le métabolisme général de *B. azoricus* étant sur ou sous-exprimées en condition BT3 comparé à la population naturelle

	<b>Surexprimé en BT3</b>	<b>Sous-exprimé en BT3</b>
<b>Glycolyse</b>	- Phosphoglycerate mutase - G3PDH	- Pyruvate kinase mito
<b>Voie des pentoses phosphates</b>	- Deoxyribose Phosphate alodolase	- G6Phosphate deshydrogénase - Transaldolase
<b>Cycle de Krebs</b>	- ATP citrate synthase	- 2-oxoglutarate deshydrogénase - Malate deshydrogenase mitochondriale - Isocitrate deshydrogenase - Aconitate hydratase
<b>Phosphorylation oxydative</b>	/	- NADH deshydrogénase
<b>β-oxidation des AG</b>	/	- 3 keto-Acyl-coA thiolase peroxisomal - 3 Hydroxybutarate deshydrogénase 2 - Electron Tranfert Flavoprotein
<b>Gluconéogenèse</b>	/	- Pyruvate mitochondriale
<b>Glucogénolyse</b>	/	- Glycogène phosphorylase

/ : pas de protéine identifiées dans cette catégorie; G3PDH : Glycéraldéhyde 3 Phosphate deshydrogenase.

Ainsi en BT3, après 27 jours éloigné du fluide, et avec une charge symbiotique très faible, il semble que le métabolisme de l'hôte ait du mal à se maintenir. De plus, nous avons observé dans cette même condition une sous-expression de pompes à protons ATP dépendante, de la transcription et de la traduction suggérant le ralentissement général du métabolisme général de l'hôte.

## b. Réponse du système immunitaire

Dans cette partie nous traiterons de l'impact de la perte des symbiotes sur le système immunitaire de l'hôte. La réponse immunitaire chez les invertébrés est uniquement innée et ne présente pas de composante acquise ou adaptative comme chez les vertébrés. Au sein de cette

réponse innée, des récepteurs, membranaires ou non, (PRRs-Pattern Recognition Receptor), détectent les invasions par des pathogènes, *via* leur liaison à des molécules bactériennes spécifiques, et activent une voie de signalisation menant le plus souvent à la synthèse de peptide antimicrobiens (PAMs). Ici, comme précédemment, nous allons comparer une à une les différentes conditions basales avec la population naturelle. Le tableau 3.6 représente les protéines branchiales de *B. azoricus* impliquées dans l'immunité et étant surexprimées dans chacune des conditions. Ces protéines sont surexprimées vis à vis de la population naturelle pour les basales, et celles surexprimées dans la population naturelle le sont par rapport aux trois conditions basale. Nous observons tout d'abord une surexpression de PRRs et/ou d'effecteurs de l'immunité dans toutes les conditions exceptées pour BT2.

Tableau 3.6: Protéines impliquées dans la réponse immunitaire. Pour la population naturelle, les protéines indiquées sont celles qui sont surexprimées dans la population naturelle comparé aux 3 conditions basale.

	PRRs	PAMs et autres effecteurs
Population naturelle	-complement c1q-like protein 4 -PGRP2	/
BT1	-LRR domain protein	-TNF isoform 1
BT2	/	/
BT3	-C type lectin domain family 6 member A -c1q domain containing protein 1q2 - Complement c1q tumor necrosis factor-related protein 3-like	- Lysozyme 3 - Echotoxin b2

Les protéines indiquées dans la ligne BT1, BT2 et BT3 sont les protéines surexprimées dans une de ces condition comparé à la population naturelle. PRRs : Pattern Recognition Receptor; PAMs: Peptides AntiMicrobiens; PGRP: PeptidoGlycan Recognition Protein ; LRR: Leucine Rich Repeat; / pas de protéine identifiées dans cette catégorie.

Quels sont les rôles de ces protéines ? Nous pouvons observer la surexpression de la protéine PGRP2 uniquement dans la population naturelle, c'est à dire dans notre condition contrôle, en présence de symbiotes. Les PGRPs (Peptidoglycan Recognition Protein) sont des PRRs qui peuvent être membranaires, cytosoliques ou sécrétées. Elles possèdent toutes la capacité de reconnaître le peptidoglycane des parois des bactéries et certaines possèdent une activité amidase leur permettant de cliver ces mêmes parois reconnues. Les PGRPs sont impliquées dans la voie Imd (Immune deficiency) menant *in fine* à la synthèse de peptides antimicrobiens, capables de détruire les bactéries pathogènes (Goto and Kurata, 2006).

Des protéines possédant des domaines C1q sont aussi surexprimées en population naturelle mais aussi en BT3. Ces protéines sont des acteurs de l'immunité dont le mode d'action serait proche de celui des lectines. Ces dernières se lient aux pathogènes afin de mettre en place et de favoriser la phagocytose et donc l'élimination de ces derniers (Bohlsón et al 2007, Gerdol et al 2011). De plus, il semblerait que les domaines C1q soient très similaires aux domaines TNF (Tumor Necrosis Factor), suggérant une origine évolutive commune de ces deux protéines (Shapiro and Scherer, 1998).

En BT1, nous observons la surexpression de deux PRRs. Le premier est une protéine contenant un domaine LRR (Leucine Rich Repeat). Ces domaines sont, dans l'association symbiotique entre les légumineuses et *Rhizobium*, associés à des récepteurs kinases qui sont impliqués dans la transduction du signal lors de l'établissement de la symbiose (Indrasumunar et al., 2015; Stracke et al., 2002). De plus, une grande majorité de TLRs (Toll Like Receptor), récepteurs de la voie Toll, possèdent une partie extracellulaire contenant un ou plusieurs domaines LRR. La voie TOLL constitue, avec la voie Imd l'une des deux voies de signalisation principales de la réponse immunitaire chez les invertébrés (Salzet, 2001; Zheng et al., 2005). La protéine TNF (Tumor Necrosis Factor) est majoritairement connue pour son rôle anti-tumoral. Les protéines de la famille des TNFs sont des cytokines qui semblent impliquées chez les invertébrés à la fois dans des processus immunitaires de phagocytose ainsi que dans des processus apoptotiques ou de prolifération cellulaire (Aggarwal, 2003). En BT3 nous observons, en plus de la surexpression de protéine à domaine C1q et d'une TNF à domaine C1q, la surexpression d'une lectine de type C. Celle-ci, comme il a été mentionné plus haut, a pour rôle la liaison aux pathogènes pour permettre leur phagocytose. Enfin, en BT3, deux effecteurs de l'immunité que nous ne retrouvons pas dans les autres conditions sont surexprimés: il s'agit de l'echotoxine b2 et du lysozyme 3. L'echotoxine est en réalité une toxine contenue dans la glande salivaire des gastéropodes leur permettant de paralyser leurs

proies (Gunji et al., 2010). Peu de données sont disponibles sur cette toxine, observée jusqu'à présent chez les gastéropodes terrestres et marins mais pas chez les bivalves, mais celle-ci pourrait être impliquée dans un processus de défense contre les prédateurs et/ou pathogènes (Dreon et al., 2013). Les lysozymes sont des enzymes impliquées à la fois dans l'immunité et la digestion (Cheng, 1983; McHenery and Birkbeck, 1985). Elles catalysent l'hydrolyse de la liaison glucosidique  $\beta$  1-4 entre l'acide N-acetylmuramique et l'acide N-acetylglucosamine présents dans la paroi peptidoglycane des bactéries (Salton 1957.; Chipman et al. 2015).

### c. Processus apoptotiques

L'apoptose et l'immunité sont dans certains cas, notamment lors d'un stress, deux processus étroitement liés. Nous avons donc cherché à déterminer si les acteurs protéiques associés à la mort cellulaire programmée étaient affectés par l'isolement sur basalte des moules et la perte concomitante de symbiotes.

Le tableau 3.7 indique les protéines différentiellement exprimées sur basalte comparé à la population naturelle. Nous pouvons tout d'abord observer la sous-expression de protéines impliquées dans l'apoptose en BT1, et le schéma complètement opposé en BT2 avec une surexpression des acteurs apoptotiques tandis qu'en BT3, le tableau est plus contrasté. Parmi ces acteurs certains sont des régulateurs positifs de la mort cellulaire et d'autres des inhibiteurs de celle-ci. Parmi les protéines sous-exprimées en BT1, se trouvent des facteurs pro et anti-apoptotiques, suggérant un équilibre entre activation et inhibition de l'apoptose dans cette condition. Il en est de même pour la condition BT2 où les protéines surexprimées cette fois-ci sont à la fois des acteurs favorisant et inhibant l'apoptose. La condition BT3 délivre un message plus clair. En effet, les protéines surexprimées dans cette condition sont pro-apoptotiques tandis que les protéines sous-exprimées (à l'exception de la protéine CRADD) sont des acteurs anti-apoptotiques. Dans cette dernière condition, il semble qu'il y ait donc une induction franche de l'apoptose dans les cellules branchiales de *B. azoricus*.



Tableau 3.7 : Protéines impliquées dans les mécanismes d'apoptoses étant différentiellement exprimées en BT1, BT2, BT3 comparé à la population naturelle

Surexprimé en BT1	Sous-exprimé en BT1
/	- Caspase partial - <b>Apoptosis 2 inhibitor</b> - Death domain-containing protein CRADD
Surexprimé en BT2	Sous-exprimé en BT2
- Caspase partial - Death-associated protein 1-like - Programmed cell death protein 4 - <b>Apoptosis 2 inhibitor</b> - <b>Macrophage migration inhibitory factor</b>	/
Surexprimé en BT3	Sous-exprimé en BT3
-Programmed cell death protein 5 -Caspase-3isoform 1 - Caspase partial	- <b>Apoptosis 2 inhibitor</b> -Death domain-containing protein CRADD - <b>Macrophage migration inhibitory factor</b>

BT1 (violet), BT2 (rouge) et BT3 (orange). / pas de protéine identifiées dans cette catégorie. En gras acteurs anti-apoptotiques, police normale acteurs pro-apoptotiques

Les résultats de l'étude du protéome branchial suite à l'isolement sur basalte et à la perte de symbiotes montre un impact sur le métabolisme et le système immunitaire de l'hôte ainsi que sur l'apoptose. Pour résumer, en BT1 le métabolisme semble ralenti mais l'immunité ne semble pas impactée alors que l'apoptose serait plutôt inhibée. En BT2, le métabolisme semble activé ainsi que la réponse apoptotique. Mais c'est globalement au bout de 27 jours sur le basalte (BT3) que les modifications du protéome sont les plus importantes, puisque nous observons une chute marquée du métabolisme basal, une synthèse de PRRs et d'effecteurs de l'immunité plus importante, et enfin une induction franche de l'apoptose.

### 3.2.2. Impact du maintien/régulation de la symbiose sur le protéome de *B.azoricus*

Après nous être focalisés sur l'impact de la perte de symbiotes sur le protéome branchial de *B. azoricus*, nous allons nous intéresser aux protéines impliquées dans le maintien ou la régulation de cette symbiose. Comme précédemment, nous allons comparer les protéomes branchiaux, mais cette fois-ci entre les conditions transloquées TR1.2 et TR1.3 et la condition BT1, prise comme référence. En effet, dans les conditions TR1.2 et TR1.3 nous observons un maintien de la charge symbiotique au niveau de BT1, et donc *a fortiori* une charge supérieure par rapport à BT2 et BT3. Le retour sur site a-t-il eu un impact sur le protéome global de ces individus, observons-nous « un retour à la normale » ?

Ici, entre 700 et 900 protéines ont été identifiées pour chaque condition (Figure 3.15).

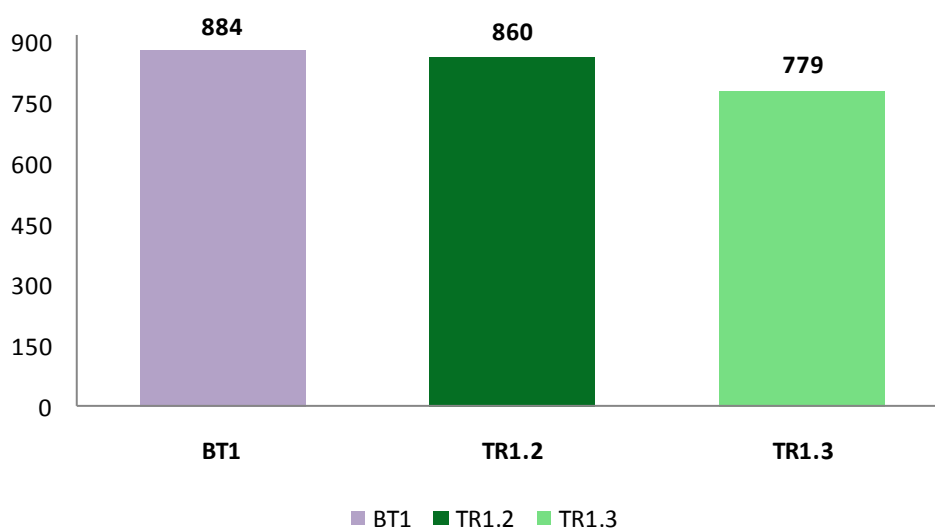


Figure 3.15 : Nombre de protéines identifiées en basalteT1 (BT1), TR1.2 et TR1.3

La comparaison du protéome branchial entre BT1 et la condition TR1.2 montre que 438 protéines sont communes et que 430 ont été identifiées seulement en BT1 et 422 seulement en TR1.2. De même, la comparaison entre BT1 et TR1.3 montre que 392 protéines sont communes, 476 ont été identifiées seulement en BT1 et 387 seulement en TR1.3 (Figure 3.16).

Comme précédemment, les protéines surexprimées en TR1.2 et TR1.3 ont été classées selon les processus biologiques dans lesquels elles sont impliquées *via* l'annotation GO (Figure 3.17 et 3.18). Globalement les protéines surexprimées en TR1.2 et TR1.3 sont impliquées dans une

même proportion dans les différents processus biologiques. Le retour sur site et le maintien de la charge symbiotique ont-ils un impact sur le métabolisme principal de l'hôte ?

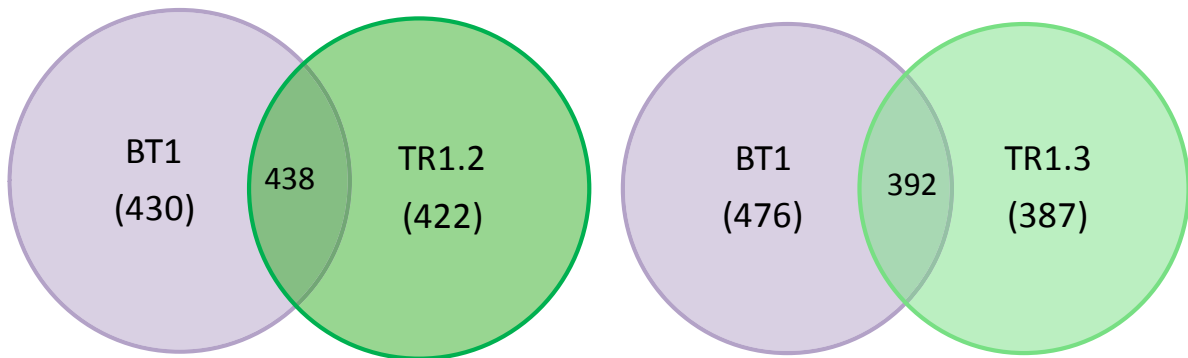


Figure 3.16 : Diagramme de Venn des protéines identifiées dans la condition BT1 et TR1.2 (à gauche) et BT1 et TR1.3 (à droite). À l'intersection des cercles se trouvent les protéines communes entre ces deux conditions, et le nombre inscrit au milieu de chaque cercle représentent les protéines présentes seulement dans cette condition.

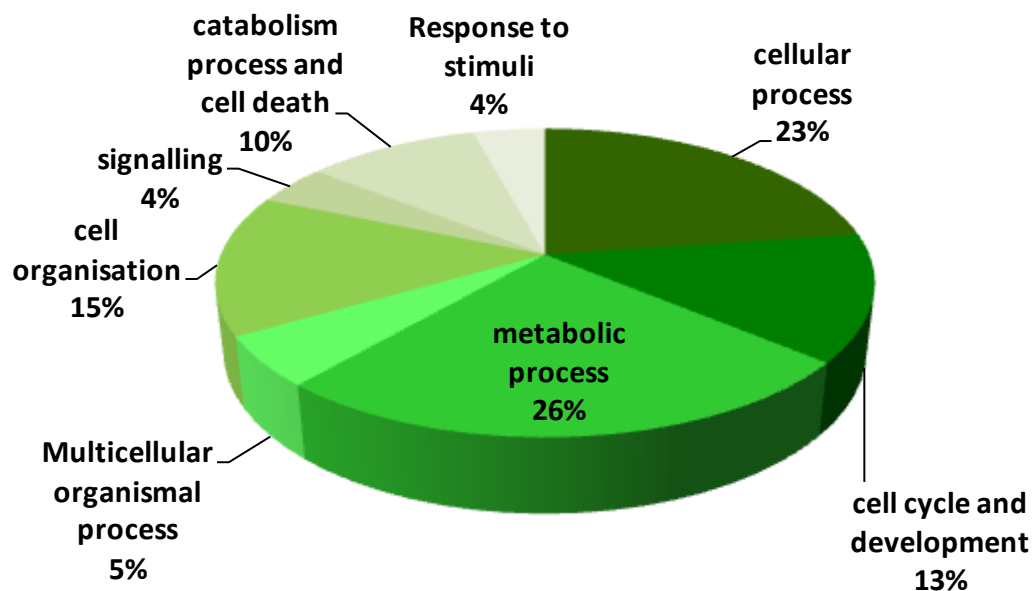


Figure 3.17: Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines surexprimées dans la condition TR1.2 vis-à-vis de la condition BT1

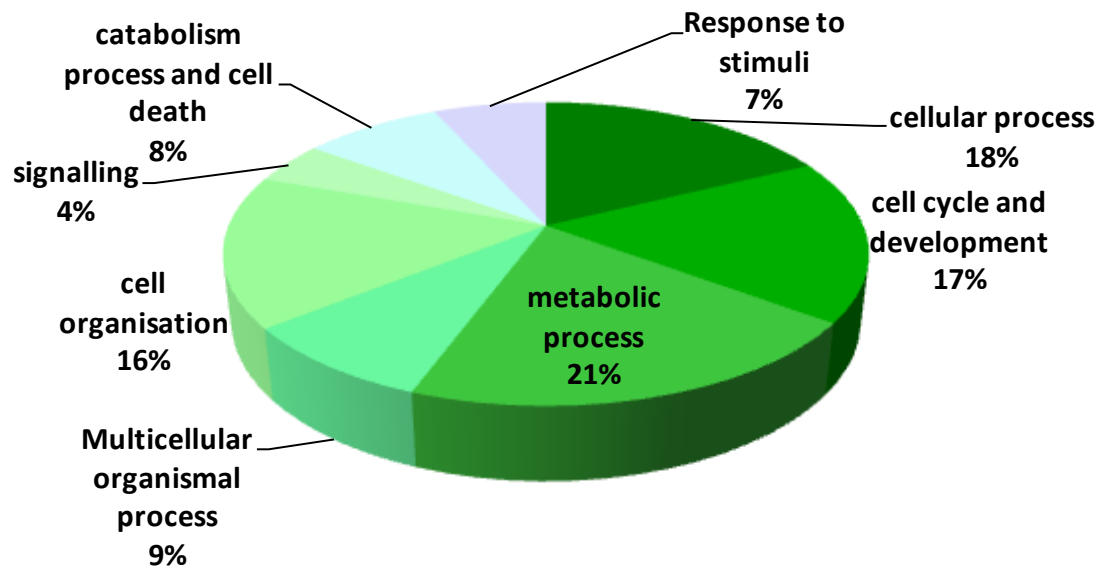


Figure 3.18: Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines surexprimées dans la condition TR1.3 vis-à-vis de la condition BT1

Les tableaux 3.8 et 3.9 présentent les protéines du métabolisme principal différentiellement exprimées par rapport à BT1. Le retour sur site semble avoir un effet positif sur le métabolisme des moules puisque en TR1.2 nous observons une surexpression de nombreuses protéines impliquées dans la glycolyse - et ce malgré la sous-expression de la G3DPH -, le cycle de Krebs, ainsi que dans la phosphorylation oxydative. En TR1.3 ce sont surtout la voie des pentoses phosphates et le cycle de Krebs qui semblent activés comparé à BT1. Ainsi le retour sur site semble activer de nouveau le métabolisme des moules qui étaient entrées dans une phase de métabolisme ralenti après 6 jours sur le basalte. Cette activation semble cependant plus marquée en TR1.2. Ainsi, il semble que dans la condition TR1.2 la glycolyse soit favorisée pour former de l'ATP et alimenter le cycle de Krebs, alors qu'en TR1.3, la voie des pentoses phosphate semble favorisée permettant la production de NADPH alimentant notamment la voie de synthèse d'acides nucléiques et de nucléotides.

Tableau 3.8: Protéines impliquées dans le métabolisme général de *B. azoricus* étant sur ou sous-exprimées en condition TR1.2 comparé à la condition BT1

	Surexprimé en TR1.2	Sous-exprimé en TR1.2
Glycolyse	-Enolase -Phosphoglycerate Kinase 1 -Phosphoglycerate mutase	-G3PDH
Voie des pentoses phosphates	-Ribulose 5 Phosphate isomerase	/
Cycle de Krebs	- Pyruvate deshydrogenase -Pyruvate mitochondrial - Isocitrate deshydrogenase	/
Phosphorylation oxydative	-Cytochrome c oxidase sous unité iii - NADH deshydrogenase - Succinate deshydrogenase	/
B-oxidation des AG	- NADP-dependent malic enzyme	

/ : pas de protéine identifiée dans cette catégorie; G3PDH : Glycéraldéhyde 3 Phosphate deshydrogenase.

Tableau 3.9 : Protéines impliquées dans le métabolisme général de *B.azoricus* étant sur ou sous-exprimées en condition TR1.3 comparé à la condition BT1.

	Surexprimé en TR1.3	Sous-exprimé en TR1.3
Glycolyse	- Phosphoglycerate kinase	- Enolase
Voie des pentose phosphate	-Transketotase like prot2 -G6Phosphate deshydrogénase - Glucose 1 deshydrogenase	/
Cycle de Krebs	-ATP citrate synthase - Glutamate deshydrogenase - Pyruvate deshydrogenase	- Isocitrate deshydrogenase
Phosphorylation oxydative	- Succinate deshydrogénase -NADH deshydrogénase	/
$\beta$ -oxydation des AG	-Long chain fatty acid ligase type 2	/

/ : pas de protéine identifiée dans cette catégorie.

Qu'en est-il des processus immunitaires et apoptotiques ? Le tableau 3.10 présente les protéines associées au système immunitaire qui se trouve surexprimées dans les différentes conditions de maintien de la charge symbiotique. Dans ce tableau, BT1 est toujours comparé à la population naturelle. La majorité des protéines impliquées ici ont été décrites plus haut. Cependant, certaines protéines ont attiré notre attention. En effet, en TR1.2 la surexpression d'une protéine impliquée dans la voie Toll suggère l'utilisation de cette voie mais la surexpression d'un inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B suggèrerait au contraire l'impossibilité de produire *via* la voie Toll/NF- $\kappa$ B des peptides antimicrobiens. Mais, nous observons en TR1.3, à savoir 7 jours après TR1.2, la surexpression d'un peptide antimicrobien, la Big Defensin 3, malgré là aussi, la surexpression d'un répresseur de la voie NF- $\kappa$ B. De plus, en TR1.3, la PGRP2 est surexprimée, comme elle l'était dans la population naturelle. Enfin, tout comme en BT3, le lysozyme 3 est surexprimé en TR1.3 ainsi que l'échotoxine b2, avec en TR1.3 la surexpression supplémentaire de l'échotoxine a.

La surexpression de trois caspases en TR1.2 (Tableau 3.11) suggère l'activation de processus apoptotiques, malgré la surexpression d'un facteur anti-apoptotique, le macrophage migration inhibitory factor (MIF). Au contraire, en TR1.3, seule la protéine MIF est surexprimée suggérant là une inhibition des processus apoptotiques.

Tableau 3.10 : Protéines impliquées dans la réponse immunitaire. Les protéines indiquées dans la ligne TR1.2 et TR1.3 sont les protéines surexprimées dans une de ces condition comparé à la condition BT1.

	PRRs	PAMs et autres effecteurs
BT1	-LRR domain protein -TNF receptor isoform 1	/
TR1.2	-LRR containing protein 16 a - LRR containing protein 59 -C-type lectin domain family 10 member a - NF-κB repressing factor like - Toll interacting protein - Cellular retinoic acid-binding protein 2	/
TR1.3	- PGRP2 -C1q domain containing protein 1q2 - C1q domain containing protein 1q49 -NF-κB repressing factor like	- Lysozyme 3 -Big defensin 3 -Echotoxin a et b2

PRRs : Pattern Recognition Receptor; PAMs: Peptides AntiMicrobiens; PGRP: PeptidoGlycan Recognition Protein ; LRR: Leucine Rich Repeat; / : pas de protéine identifiées dans cette catégorie.

Tableau 3.11 : Protéines impliquées dans les mécanismes de catabolisme et d'apoptose étant sur ou sous-exprimées en condition TR1.2 (en haut), TR1.3(en bas) comparé à la condition BT1.

Surexprimé en TR1.2	Sous-exprimé en TR1.2
- Caspase-10 - Caspase-2 - Initiator caspase -Death associated protein 1-like - <b>Macrophage migration inhibitory factor</b> - Programmed cell death protein 4	/
Surexprimé en TR1.3	Sous-exprimé en TR1.3
- <b>Macrophage migration inhibitory factor</b>	/

/ : pas de protéine identifiées dans cette catégorie. En gras, acteurs anti-apoptotiques.



Ainsi, les moules qui ont été transloquées ont maintenu leur charge symbiotique et semblent aussi avoir retrouvé un métabolisme « normal » avec un retour à des niveaux d'expression proches de la condition population naturelle des enzymes de la glycolyse et du cycle de Krebs. En termes d'immunité et d'apoptose les modioles répondent différemment aux deux temps de translocation. En effet, en TR1.2 nous observons une surexpression d'un acteur de la voie Toll suggérant une activation de cette dernière, mais la surexpression d'un facteur de répression de la voie NF- $\kappa$ B indique le contraire, à savoir l'absence de production de PAMs. De plus, dans cette même condition, la surexpression des caspases 2 et 10 et d'un initiateur de caspase, milite fortement pour l'activation de l'apoptose. Parallèlement en TR1.3, nous observons la surexpression et donc la production du PAM Big Defensin 3 ainsi que du Lysozyme 3, que nous retrouvons également surexprimés en BT3. Tout ceci suggère, lors de la translocation, une nécessité pour l'organisme de répondre à la présence de bactéries dans son environnement proche, que ce soit de potentielles bactéries symbiotiques ou des pathogènes. Cependant, dans cette même condition, et contrairement à TR1.2 et BT3, aucune protéine pro-apoptotique n'est surexprimée.

## 4. Approche transcriptomique

### 4.1. Protocole expérimental

#### 4.1.1. Marquage des sondes et hybridation des micro-array :

Une lame oligoarray de format 8x105K constituée d'oligonucléotides de 60 bp a été produite à partir du transcriptome de *B. azoricus* issus de la fusion de plusieurs jeux de données de séquençage par RNAseq que ce soit en Illumina (en collaboration avec le laboratoire de Nori Satoh (OIST) dans le cadre du programme JST CNRS/Japon) ou en 454 (Programme Marine Genomics Europe). Le logiciel Agilent eArray (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) a été utilisé pour dessiner les sondes oligonucléotidiques. Le jeu de données finale inclut 61300 ADNc unique expressed sequence tag (EST) et 27062 sondes annotées correspondant à 13000 gènes uniques venant du séquençage du transcriptome de *B. azoricus*. Les sondes ont été synthétisées sur les lames de format 8x105k par la société Agilent et celles servant au contrôle positif et négatif ont été ajoutées. Les séquences des sondes sont disponibles dans la base de données « Gene Expression Omnibus » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) sous le numéro d'accès XXXXX.

#### 4.1.2. Hybridation des lames:

Les ARN totaux ont été extraits sur les branchies d'individus issus de population naturelle ou d'expérimentations *in situ* (pool de 10 individus/condition) dans un tampon TRIzol reagent (Sigma-Aldrich, USA). La concentration en ARN est ensuite déterminée en utilisant un NanoDrop\_ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., DE, USA) à l'aide des ratios 260/280 et 260/230. Les sondes marquées (Cy3 et Cy5) ont été ensuite synthétisées à partir de 200 ng d'ARN totaux selon le protocole décrit dans le kit de synthèse Agilent Low Input Quick Amp labeling Kit. Les sondes marquées ont été ensuite purifiées à l'aide du kit « Kit Illustra CyScribe Gfx purification » (GE HealthCare) et leur qualité et quantité ainsi que le *ratio* d'incorporation des fluorochromes ont été déterminés à l'aide du NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Delaware, USA). Pour l'hybridation microarray, 800ng de sondes ont été fragmentés à 60°C pendant 30 min à l'aide d'un tampon de fragmentation (Agilent Technologies, USA) puis 25µl de 2X hybridization buffer (Agilent Technologies, USA) a été ajouté avant le dépôt sur lame. Les lames sont hybridées à 65°C dans des chambres d'incubation (Appligen, USA) et placées dans un four à hybridation pendant 17 h. S'ensuit différents lavages : 500 ml de tampon 1 de lavage 1min/RT (Agilent Technologies, IncWilnington, USA and 250ml Triton 10x) puis dans 500 ml de tampon 2 1min/37°C (Agilent Technologies, IncWilnington, USA and 250 ml Triton 10x) et finalement rincées dans de l'acétonitrile (200ml)/10 sec. Les lames ont été ensuite scannées à l'aide du scanner Agilent G2565CA qui permet une lecture à haute résolution (3 µm). L'hybridation et le scan des lames ont été réalisés sur la plateforme du Laboratoire de génétique moléculaire (CHRU MORVAN de Brest).

#### 4.1.3. Analyse des données

Le protocole d'analyse de données a été réalisé comme décrit par Boutet et collaborateurs en 2011, en utilisant à la fois le langage statistique de R studio, BioConductor (Gentleman et al 2004) et la banque de données Limma (Smyth et al 2005). La correction du bruit de fond associé à l'intensité des sondes a été réalisée *via* la méthode normexp (Ritchie et al 2007). Les artefacts techniques ont été supprimés en utilisant une normalisation quantile. Enfin, seules les sondes ayant une intensité de signal trois fois supérieur au bruit de fond dans plus de 20% des échantillons ont été gardées pour l'analyse. L'ensemble des valeurs d'intensité a ensuite

été converti en valeur de Log2 puis centrées pour chaque gène avec la moyenne d'expression du gène considéré dans l'ensemble des conditions. L'analyse des données a ensuite été poursuivie à l'aide du logiciel TmeV (<http://www.m4.org:mev.html>) permettant tout d'abord un regroupement hiérarchique en utilisant la distance métrique euclidienne. Puis, l'outil KMC (K-Means Clustering) a été utilisé afin d'identifier des clusters de gènes se comportant de façon similaire dans les différents échantillons, et la fonction FOM (Figure of Merit) a permis de déterminer le nombre optimal de clusters. Enfin, le programme SAM (Significant Analysis Microarray) recherche des gènes significativement régulés sur chacun des clusters en utilisant des paramètres d'analyse stricts et identiques pour tous les clusters et toutes les comparaisons. Le test SAM a été exécuté avec 100 permutations et le FDR retenu était inférieur à 5% afin de limiter le nombre de faux-positifs.

## 4.2. Résultats

Après avoir identifié quelques acteurs protéiques différentiellement régulés en réponse à la perte symbiotique, nous nous sommes intéressés à cette réponse au niveau transcriptomique. En effet, l'intégration des données nous semble indispensable afin de comprendre au mieux la réponse de l'holobionte aux changements d'environnement. Dans cette partie, seules les conditions de perte symbiotique (BT1, BT2 et BT3) et la condition de référence population naturelle ont été analysées, la partie maintien de la charge symbiotique étant encore en cours d'analyse au moment de la rédaction de ce mémoire. De plus, la démarche comparative adoptée est différente dans cette partie transcriptomique. En effet, sur les 13000 gènes uniques provenant du séquençage de *B. azoricus*, environ 6500 gènes semblent différentiellement exprimés entre les conditions BTx et population naturelle. Du fait de ce nombre important nous n'allons pas comparer les conditions basales une à une à la population naturelle, mais, des clusters de gènes seront constitués en fonction des tendances (sur ou sous-expression des gènes) de ceux-ci dans les différentes conditions.

La figure 3.19 montre les six clusters formés suite à cette analyse ainsi que les gènes différentiellement exprimés dans ces comparaisons. Parmi ceux-ci trois comparaisons ressortent :

- Comparaison des conditions BTx avec la population naturelle
- Comparaison de BT1 avec toutes les autres conditions

A la recherche d'acteurs moléculaires de la symbiose chez *B. azoricus*, une approche globale

- Comparaison de BT2/BT3 avec la population naturelle/BT1.

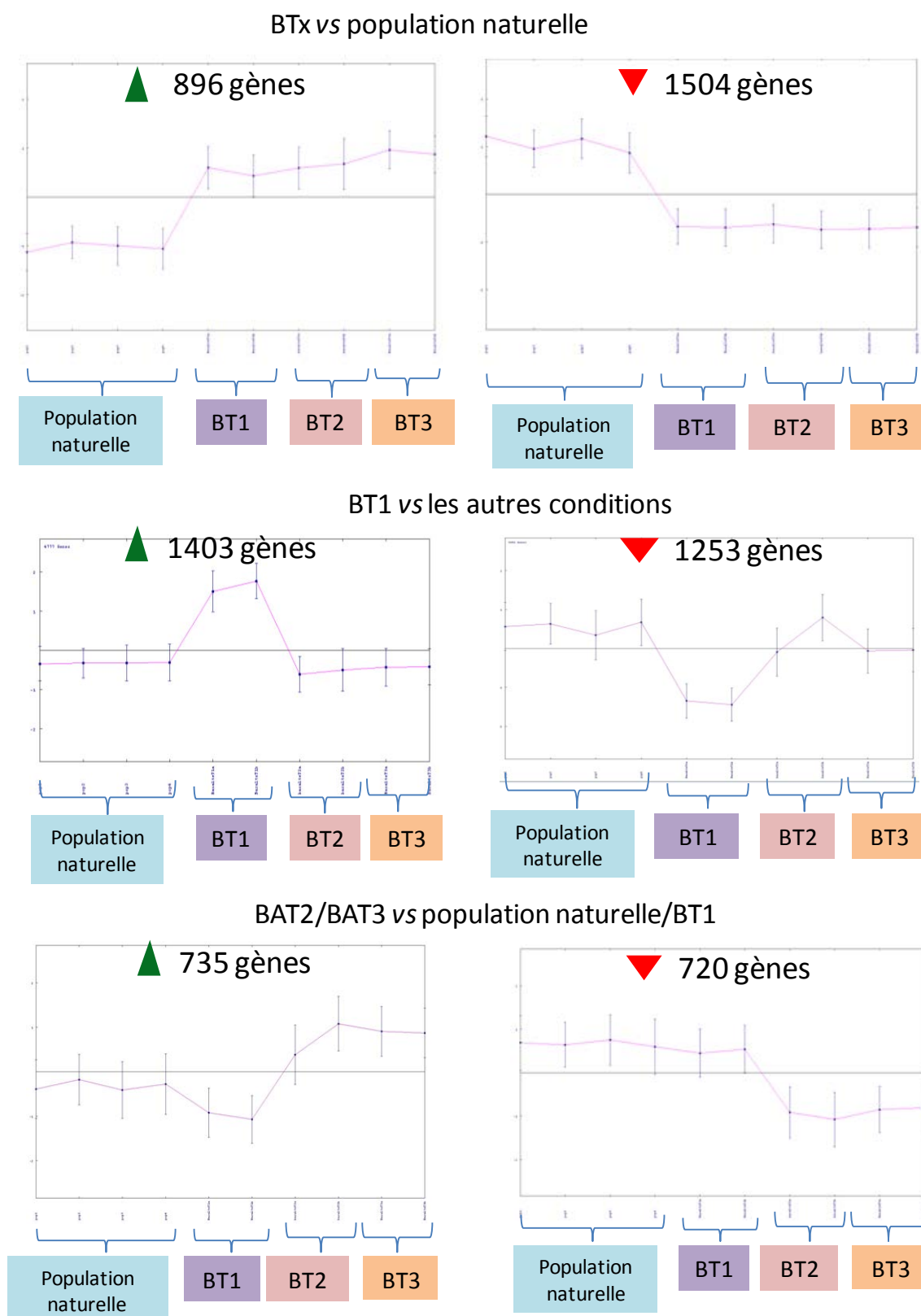


Figure 3.19 : tendances des gènes dans les six clusters formés et nombres de gènes sur et sous-exprimés. Ces six clusters représentent trois comparaison: BTx vs population naturelle, BT1 vs les autres conditions, et BT2/BT3 vs population naturelle et BT1. Analyses menée sur 4 réplicats pour la population naturelle et 2 réplicats pour chaque condition basalte

L'analyse des gènes du métabolisme montre très peu de différentiel d'expression lorsque nous comparons les conditions basales avec la population naturelle. Si l'on s'intéresse au détail, c'est-à-dire aux gènes différentiellement régulés en BT1 et BT2/BT3, nous observons une absence de corrélation au niveau protéomique et transcriptomique en BT1. En effet alors que nous pouvions observer une diminution du métabolisme global au niveau protéique, notamment pour la glycolyse et la voie des pentoses phosphates, aucun impact n'est observable sur ces voies en transcriptomique. Au contraire, aucune enzyme du cycle de Krebs n'était différentiellement régulée en protéomique alors que deux enzymes de ce même cycle sont surexprimées en transcriptomique. Par contre, l'étude de BT2/BT3 au niveau transcriptomique montre une sous-expression d'enzymes du cycle de Krebs, ce qui est en accord avec les données protéomiques pour BT3. De même, l'analyse des gènes impliqués dans les processus d'apoptose et d'immunité révèle l'expression différentielle de nombreux gènes dont certains absents des données de protéomique.

#### - Processus apoptotiques

Au sein de ces trois comparaisons nous nous sommes intéressés aux acteurs pro et anti-apoptotiques étant différentiellement régulés (Tableau 3.12).

Tableau 3.12 : Protéines pro ou anti-apoptotiques différemment exprimées entre les trois comparaisons.

Protéines surexprimées en BASALTES		Protéines sous-exprimées en BASALTES	
Acteurs pro-apoptotiques	Acteurs anti-apoptotiques	Acteurs pro-apoptotiques	Acteurs anti-apoptotiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Caspases 3, 3b, 8</li> <li>-tp53 regulating Kinase</li> <li>-tp53 ek binding protein</li> <li>-Death-associated protein 1-like</li> <li>-Programmed cell death protein 4</li> <li>-TNF <math>\alpha</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Apoptosis 2 inhibitor</li> <li>-Inhibitor of apoptosis protein</li> <li>-Probable bax inhibitor 1-like</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Programmed cell death 6 interacting protein</li> </ul>	
Protéines surexprimées en BT1		Protéines sous-exprimées en BT1	
Acteurs pro-apoptotiques	Acteurs anti-apoptotiques	Acteurs pro-apoptotiques	Acteurs anti-apoptotiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Caspase 3 7-3</li> <li>-tp53 protein Kinase</li> <li>-Programmed cell death protein 2</li> <li>-TNF receptor associated protein factor 7</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-FAS apoptotic unhibitory molecule 2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Cell death protein 3</li> <li>-Caspase 7</li> </ul>	
Protéines surexprimées en BT2/BT3			
Acteurs pro-apoptotiques	Acteurs anti-apoptotiques		
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Caspase 3</li> <li>-Initiator caspase</li> <li>-FAS ligand</li> <li>-TNF ligand superfamily</li> </ul>			

Dans les conditions basales, nous observons une induction de nombreux transcrits liés à l'apoptose et incluant notamment des caspases. Ces dernières peuvent être des initiateurs ou effecteurs (exécutants) de l'apoptose *via* la voie intrinsèque (réponse au stress oxydatif notamment) ou extrinsèque. Quelque soit la voie empruntée, les caspases sont des protéines constituant le cœur de la machinerie apoptotique et dont la surexpression suggère fortement l'induction du processus apoptotique (Romero et al., 2011). La comparaison entre BT2/BT3 et la population naturelle/BT1 où en plus de la caspase 3 et d'une caspase d'initiation, nous observons la surexpression de ligands apoptotiques tel que TNF et FAS, nous amène à penser qu'il y a bien une induction de l'apoptose en conditions BT2/BT3. Au contraire, dans les comparaisons entre les conditions basales et la population naturelle ou entre BT1 et les autres conditions, nous pouvons observer une surexpression de facteurs pro- et anti-apoptotiques ainsi qu'une sous-expression de facteurs pro-apoptotiques. Globalement ces résultats suggèrent une induction de l'apoptose dans les conditions basales. L'apoptose est un processus biologique nécessaire au développement et au maintien du système immunitaire. Si la perte de symbiotes induit des processus apoptotiques, qu'en est-il du système immunitaire ?

Tableau 3.13: Protéines impliquées dans les processus immunitaires chez *B.azoricus* . Les protéines sont surexprimées (vert) ou sous-exprimées (rouge) dans les conditions basaltes ou BT1 seulement ou BT2/BT3, par rapport aux autres conditions.

	<b>PRRs</b>	<b>Transduction du signal immunitaire</b>	<b>PAMs et autres effecteurs</b>
Basaltes	-TLR 1 et 13 - Leucine Rich-Repeat protein -Complement c1q tumor necrosis factor-related protein 2	- Toll interacting protein -Myd88 - Nf-κB inhibitor interacting protein	
BT1	-TLR 22 -PGRP2	-MyD88	-Suppressor of cytokin signaling
BT2/BT3	-TLR 20 a - C-type lectin domain family 4, 6 member k and a	/	-Lysozyme 3 -Immune-responsive gene 1 - Defense protein partial
Basaltes	/	/	/
BT1	-TLR 2	/	/
BT2/BT3	-PGRP2	-Myd88	-Cytokine receptor sous unité γ

PRR: Pattern Recognition Receptor; PAM: Peptides AntiMicrobiens; TLR: Toll Like Receptor; MyD88 : Myeloid Differentiation primary response protein 88; PGRP: Peptidoglycan Recognition Protein

Le tableau 3.13 résume les gènes induits ou réprimés dans les trois comparaisons présentées précédemment, et classés selon leurs fonctions: reconnaissance (PRRs), transduction du signal, effecteurs et peptides antimicrobiens. Ces trois grandes fonctions au sein des deux voies majoritaires (Toll et Imd) permettent, à partir de la détection d'un pathogène, la mise en place de processus menant à la destruction de ce dernier. Nous observons une surexpression globale dans les conditions basaltes des Toll-Like Receptor, impliqués surtout dans la reconnaissance de bactérie Gram<sup>+</sup>. Il faut cependant noter la répression du TLR 2 en BT1 par rapport aux autres conditions. Parallèlement, un récepteur de la voie Imd, le PGRP2 est surexprimé en BT1 et inhibé en BT2/BT3. Ainsi il semble que suivant les conditions, les deux



voies de signalisation immunitaires ne soient pas régulées de la même façon. En conditions basales, la surexpression des TLRs est associée à une surexpression d'une protéine d'interaction avec les récepteurs Toll, ainsi que MyD88, suggérant jusque-là, une activation de la voie Toll menant *in fine* à la synthèse de peptides antimicrobiens. Cependant, dans cette même condition, l'induction d'un inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B, ainsi que l'absence d'induction de PAMs, viennent contredire cette hypothèse. Si nous nous intéressons uniquement à BT1, nous observons une surexpression de récepteurs des voies Toll et Imd, ainsi que de MyD88, suggérant là encore une activation de ces deux voies. Mais, de même que précédemment, nous n'avons pas observé d'induction de PAMs. En BT2/BT3, le message semble différent, en effet seul un TLR est surexprimé et contrairement aux autres conditions, la protéine MyD88, nécessaire à la transduction du signal dans la voie Toll, est réprimée. Étonnamment, c'est dans cette condition que nous observons l'induction de gènes impliqués dans la réponse directe aux pathogènes tels que le lysozyme 3, les lectines, ou les gènes Immune-responsive gene 1 et Defense Protein partial.

Ces résultats bien que globaux, attestent des conséquences de la perte de symbiotes sur les gènes impliqués dans des processus de défense chez *B. azoricus*. Globalement, il semble que la perte de symbiotes induise une réponse immunitaire soit *via* les voies « classiques » de l'immunité, par l'utilisation de voies ou récepteurs différents pour chaque condition, soit *via* la mise en place de mécanismes apoptotiques dans certaines cellules branchiales.

## 5. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats issus d'une approche exploratoire ayant pour but de détecter les acteurs moléculaires de la symbiose chez *B. azoricus*. Cette démarche a été mise en place aux niveaux protéomique et transcriptomique sur des individus issus d'expérimentations *in situ*. Celles-ci ont eu lieu sur le fond marin à quelques mètres du site Montségur, de façon à observer l'impact en terme moléculaire d'une perte et d'une réacquisition éventuelle de symbiotes dans le milieu naturel de *B. azoricus*, sans changement de pression. La première étape fut de s'assurer de l'effet de cet éloignement du fluide puis du retour sur site sur la charge symbiotique. Nous avons ainsi pu observer une perte significative des symbiotes après 20 et 27 jours sur le basalte, tandis que les moules replacées sur site après un isolement de 6 jours présentent une charge symbiotique similaire à celle des moules ayant passées 6 jours sur le basalte (BT1), c'est-à-dire approximativement la moitié de la charge symbiotique des moules de la population naturelle. Ces résultats nous ont amené à nous questionner sur l'état physiologique des symbiotes présents dans ces différentes conditions. En BT2 et BT3, les symbiotes résiduels conservent-ils la capacité à métaboliser les quelques composés réduits potentiellement encore présents dans l'environnement ? Après retour sur site, l'accession retrouvée aux composés réduits n'étant plus limitante, le métabolisme des sulfures retrouve-t-il le même niveau que celui observé chez des symbiotes de la moulière ? (Ici seules les bactéries SOX ont été étudiées, la quantité de bactéries MOX dans les différentes conditions étant trop faible dans cette population pour mesurer l'impact des manipulations *in situ*). Quelle est l'activité métabolique des symbiotes dans les différentes conditions ? Pour répondre à ces questions, nous avons déterminé le niveau d'expression de l'ATP sulfurylase, enzyme importante dans l'oxydation du sulfure d'hydrogène. Les résultats obtenus sont surprenants puisqu'ils montrent que le niveau d'expression de l'ATP sulfurylase est inversement proportionnel à la quantité de SOX. Le même résultat a été obtenu avec l'enzyme HupL impliquée dans l'oxydation du dihydrogène. A partir de ces résultats, nous pouvons alors formuler l'hypothèse suivante: plus l'accès aux composés réduits est difficile pour les symbiotes et plus ceux-ci augmentent la quantité d'enzymes impliquées dans l'oxydation de ces composés réduits, afin d'optimiser leur exploitation et maximiser ainsi la production d'énergie utilisée par la bactérie et l'hôte. Au contraire, le retour sur site et donc l'accès retrouvé aux composés réduits présents dans le fluide hydrothermal, se traduit par une augmentation de l'activité ATP sulfurylase à court terme (TR1.2) et de l'HupL à plus long

terme. Ceci pourrait s'expliquer par un besoin en énergie important lors du retour sur site, et une disponibilité plus importante de sulfure d'hydrogène dans l'environnement (Petersen et al., 2011). Une étude proche de la nôtre a été effectuée en 2009 par Caro et collaborateurs. Ils ont en effet étudié l'impact d'un long jeûne (quatre mois) sur la densité symbiotique du Lucinidae *Codakia orbicularis*. Ils ont tout d'abord observé que le jeûne prolongé menait à une chute de 1/3 de la population symbiotique par mois. Ils observent ainsi que ce jeûne prolongé de l'hôte induit un jeûne chez les symbiotes, menant à une réduction de leur taille et de leur contenu en acides aminés. Ces données associées aux observations au microscope électronique à transmission les amènent à suggérer que la survie de l'hôte dans ces conditions repose sur la digestion des symbiotes ce qui constituerait alors le principal apport de nutriments (Caro et al., 2009). De même, Kadar et collaborateurs (2005) ont observés chez des moules *B. azoricus* issues du site Menez Gwen et maintenues en aquarium à pression atmosphérique sans composés réduits, une perte symbiotique ainsi qu'une diminution de la taille des branchies (Kádár et al., 2005).

## 5.1. Impact sur le métabolisme

### 5.1.1. Perte des symbiotes

L'étude protéomique et transcriptomique des voies métaboliques majeures de l'hôte dans les conditions basales suggère une diminution du flux dans celles-ci pour les conditions BT1 et BT3, ce qui n'est étonnamment pas le cas en BT2. Les figures 3.20, 3.21 et 3.22 montrent respectivement, les enzymes sur et sous-exprimées dans la glycolyse, le TCA cycle et la voie des pentoses phosphates.

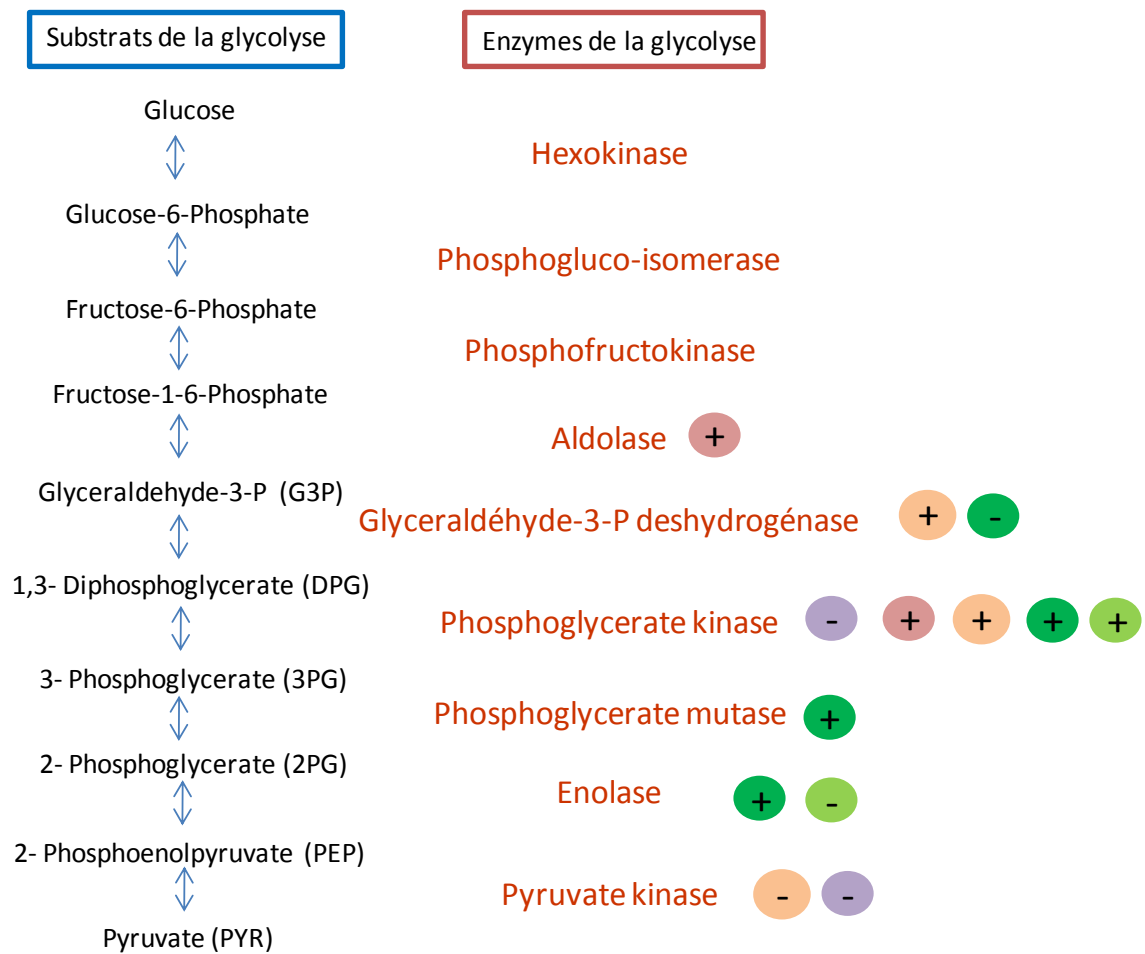


Figure 3.20 : Schéma simplifié des substrats et enzymes de la glycolyse. Les + et - correspondent aux enzymes sur et sous-exprimées dans les conditions basales et transloquées. En violet BT1, rose BT2 et orange BT3, vert foncé TR1.2, vert clair TR1.3

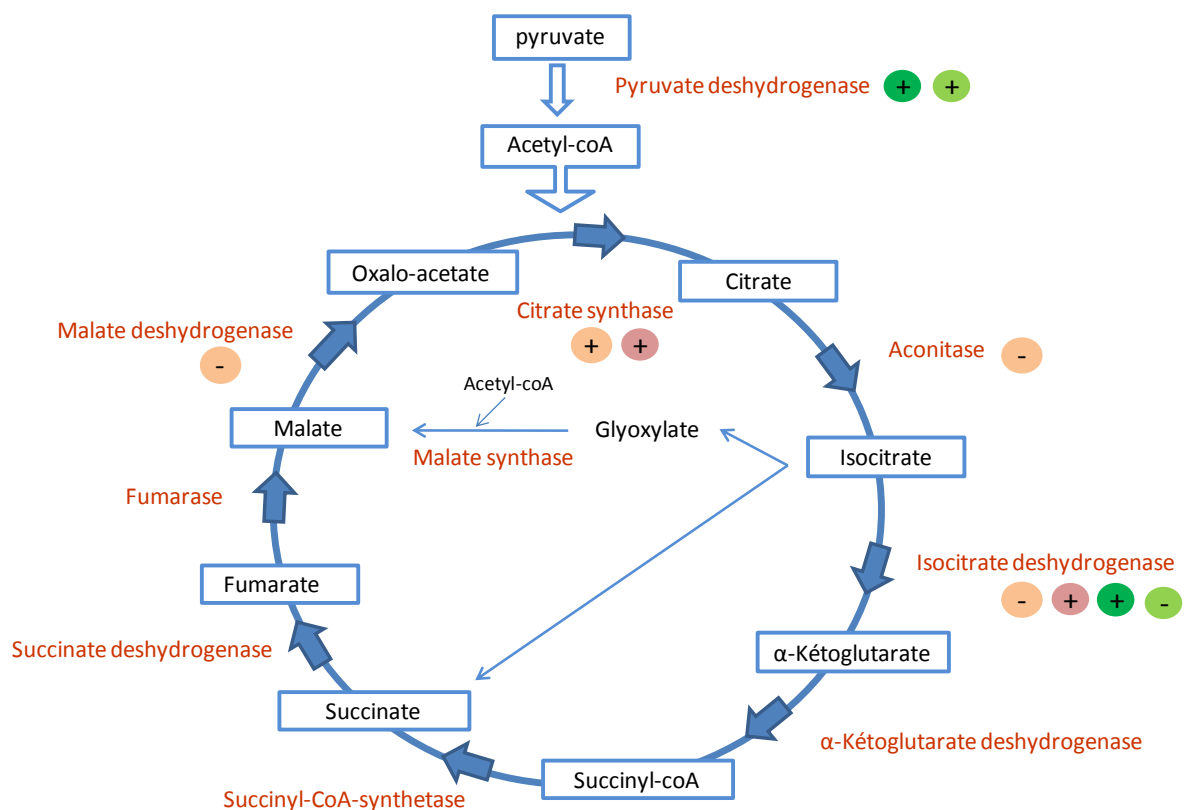


Figure 3.21 : Schéma simplifié des substrats et enzymes du cycle de Krebs. Les + et - correspondent aux enzymes sur et sous-exprimées dans les conditions basales et transloqués. En violet BT1, rose BT2 et orange BT3, vert foncé TR1.2, vert clair TR1.3

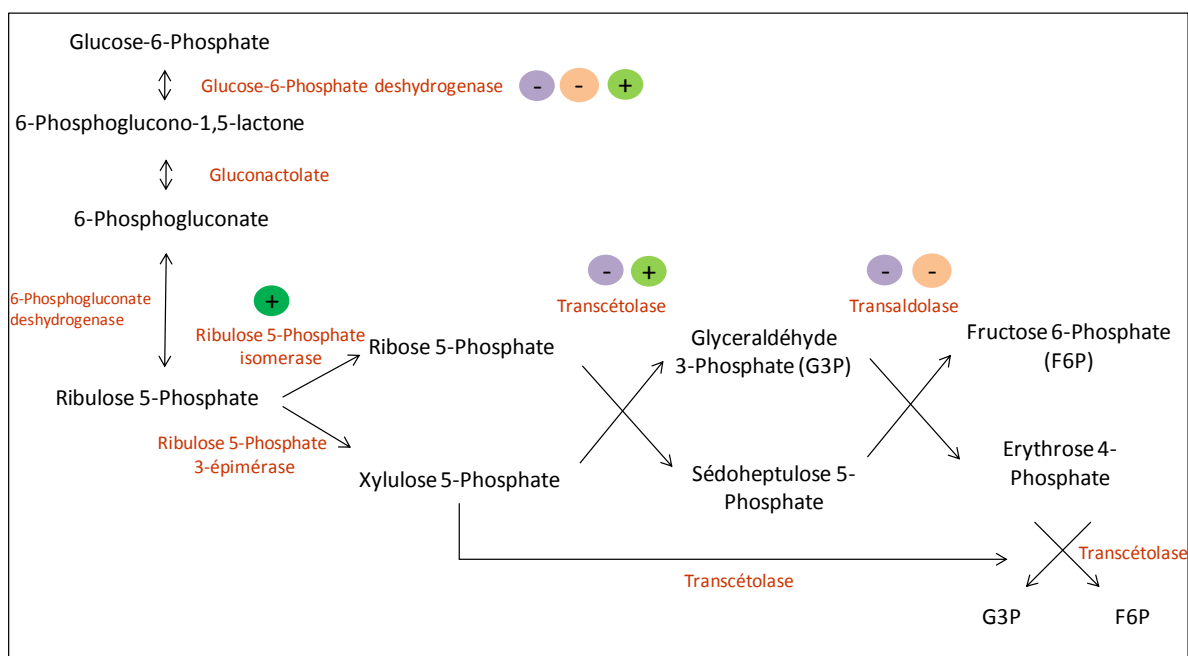


Figure 3.22 : Schéma simplifié des substrats et enzymes de la voie des pentoses phosphates. Les + et - correspondent aux enzymes sur et sous-exprimées dans les conditions basales et transloqués. En violet BT1, rose BT2 et orange BT3, vert foncé TR1.2, vert clair TR1.3.

On observe à partir de ces figures une sous-expression d'enzymes impliquées dans la glycolyse et la voie des pentoses phosphate en BT1, mais pas d'impact de la mise sur basalte sur le cycle de Krebs. Le glucose-6-phosphate est utilisé soit par la glycolyse soit par la voie des pentoses phosphates en fonction des besoins de la cellule. La glycolyse mènera à la formation d'ATP et de pyruvate alimentant le cycle de Krebs, alors que la voie des pentoses phosphates permettra la formation de NADPH, précurseur de synthèse de nucléotides, acides nucléiques et coenzymes. Ici, nous pouvons émettre l'hypothèse de l'utilisation préférentielle de la glycolyse afin de former du pyruvate pour le cycle de Krebs ce dernier n'étant pas impacté par l'isolement sur le basalte, et une répression de la voie des pentoses phosphates. Dans cette hypothèse les enzymes de la glycolyse sous-exprimées en BT1 (Pyruvate kinase et Phosphoglycérate kinase) seraient une conséquence de la régulation du flux métabolique au sein de cette voie. Le changement d'environnement vers un milieu moins riche en composés réduits et en substances à filtrer, ainsi que le stress induit par ce changement ont un effet négatif sur le fonctionnement du métabolisme de *B. azoricus*. Cet effet semble d'autant plus important en BT3, puisque la glycolyse, le cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphates sont alors affectés. De plus, nous avons observé une sous-expression dans cette même condition des pompes à protons ATP dépendantes, et des enzymes impliquées dans les processus de transcription et de traduction. Ces données suggèrent qu'après 27 jours sur le basalte, *B. azoricus*, entre dans un état de réelle dépression métabolique. La dépression métabolique est une stratégie de survie commune dans le règne animal se produisant le plus souvent en réponse à un stress environnemental (jeûne prolongé, anoxie, augmentation ou diminution de la température) (Storey and Storey, 2004). La dépression métabolique induit une diminution de l'activité des enzymes impliquées dans les voies métaboliques majeures. Le plus souvent cette diminution d'activité est liée à la phosphorylation de ces enzymes, les rendant inactives. Cette phosphorylation est cependant réversible. De plus, la dépression métabolique entraîne la diminution de l'activité des pompes à protons ATP dépendantes ainsi que la suppression de la synthèse protéique (Guppy et al., 1994; Hand and Hardewig, 1996; Storey and Storey, 2004). Cependant, nous observons, en BT3, la surexpression de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase ainsi que de l'enzyme citrate synthase, ce qui suggère l'utilisation de voies parallèles, par exemple la synthèse directe d'oxalo-acétate à partir du pyruvate catalysée par la phosphoenolpyruvate carboxykinase, afin de produire de l'énergie pour l'organisme.

Enfin BT2 semble être « l'exception qui confirme la règle » en effet après 20 jours sur le basalte et une densité symbiotique proche de celle de BT3, l'activité des principales voies métaboliques semble être activée. Deux enzymes de la glycolyse et du TCA cycle sont surexprimées dans cette condition, tandis qu'aucune enzyme de la voie des pentoses phosphates ne présente de différentiel d'expression. Ceci suggère un besoin rapide d'énergie pour l'organisme, favorisant la glycolyse plutôt que la voie des pentoses phosphates et la production d'acides nucléiques et de nucléotides. On peut en effet supposer que lors d'une longue période de jeûne, les nucléotides et acides nucléiques sont plutôt recyclés que néo-synthétisés, pour minimiser la consommation d'énergie. L'impact sur la phosphorylation oxydative est plus difficile à évaluer, du fait de la complexité et de la diversité des constituants de cette voie, et d'autre part de la multi-fonctionnalité de certains de ces constituants. Ainsi, le Cytochrome c est un acteur majeur de phosphorylation oxydative permettant le transfert des électrons du complexe III au complexe IV, mais est également directement impliqué dans l'activation/répression de la voie intrinsèque de l'apoptose (Lockshin and Zakeri, 2004). Ces résultats concernant l'impact de la perte ou du maintien des symbiotes sur le métabolisme de *B. azoricus* restent fragiles et difficiles à analyser d'une part car très peu de données existent sur les molécules organiques transférées à l'hôte par le symbiote, et d'autre part car d'autres voies non explorées peuvent contrôler ou alimenter les voies du métabolisme principal. Un examen des métabolites et réserves énergétiques (glucides, lipides, protides..) dans les différents tissus et dans les différentes conditions nous permettrait de mieux comprendre l'état physiologiques des moules issus des expérimentations *in situ*.

### 5.1.2. Maintien de la densité symbiotique

Les individus retournés sur site (transloqués) ont de nouveau accès au fluide et aux composés réduits qui le composent et maintiennent leur densité symbiotique. Les résultats des différentiels d'expression d'enzymes du métabolisme suggèrent, après les variations observées en BT1, un « retour à la normale » dans les principales voies du métabolisme. Cependant cette reprise est plus flagrante en TR1.2 où de nombreuses enzymes sont surexprimées dans les trois voies. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de voies parallèles. En effet, la sous-expression de l'isocitrate déshydrogénase en TR1.3 par exemple, suggère la production de succinate à partir de l'isocitrate sans passer par la production de d' $\alpha$ -cétoglutarate et de succinyl-CoA (Figure 3.20).

## 5.2. Impact sur le système immunitaire

### 5.2.1. Perte de symbiote

La figure 3.23 résume les gènes sur et sous-exprimés dans les trois comparaisons définies précédemment. Nous observons dans les trois conditions BTx une surexpression de deux récepteurs TLRs ainsi que d'une protéine à domaine LRR, suggérant l'activation de la voie Toll. Ceci est corrélé à la surexpression de MyD88. Cependant la surexpression de TOLLIP, inhibiteur de la protéine IRAK impliquée dans la transduction du signal ainsi que d'un inhibiteur du facteur de transcription NF- $\kappa$ B indique un arrêt de cette voie de transduction, inhibant ainsi la production d'effecteur de l'immunité. Si nous regardons les conditions basales en détail, nous observons en BT1 la surexpression à la fois d'un récepteur impliqué dans la voie Toll ainsi que de MyD88 mais aussi de la PGRP 2 probablement impliquée dans la voie Imd. Ici, aucun inhibiteur n'est surexprimé, suggérant une activation d'une ou des deux voies principales de l'immunité. Aucun peptide antimicrobien n'a été identifié comme différentiellement exprimé, cependant la surexpression d'un suppresseur de cytokines suggère une inhibition de la synthèse de ces effecteurs. Enfin, dans les conditions BT2/BT3, il semble qu'une réponse immunitaire *via* la voie Toll soit activée, puisqu'un TLR est surexprimé ainsi que des effecteurs de l'immunité comme un lysozyme (isofome 3), impliqué dans la reconnaissance et la lyse des parois bactériennes, l' Immune-responsive gene 1 qui code pour une enzyme synthétisant l'acide itaconique (inhibiteur de l'isocitrate lyase (Michelucci et al., 2013)), une « Defense protein partial » dont les fonctions exactes sont inconnues et une lectine de type C impliquée dans l'opsonisation et la phagocytose.



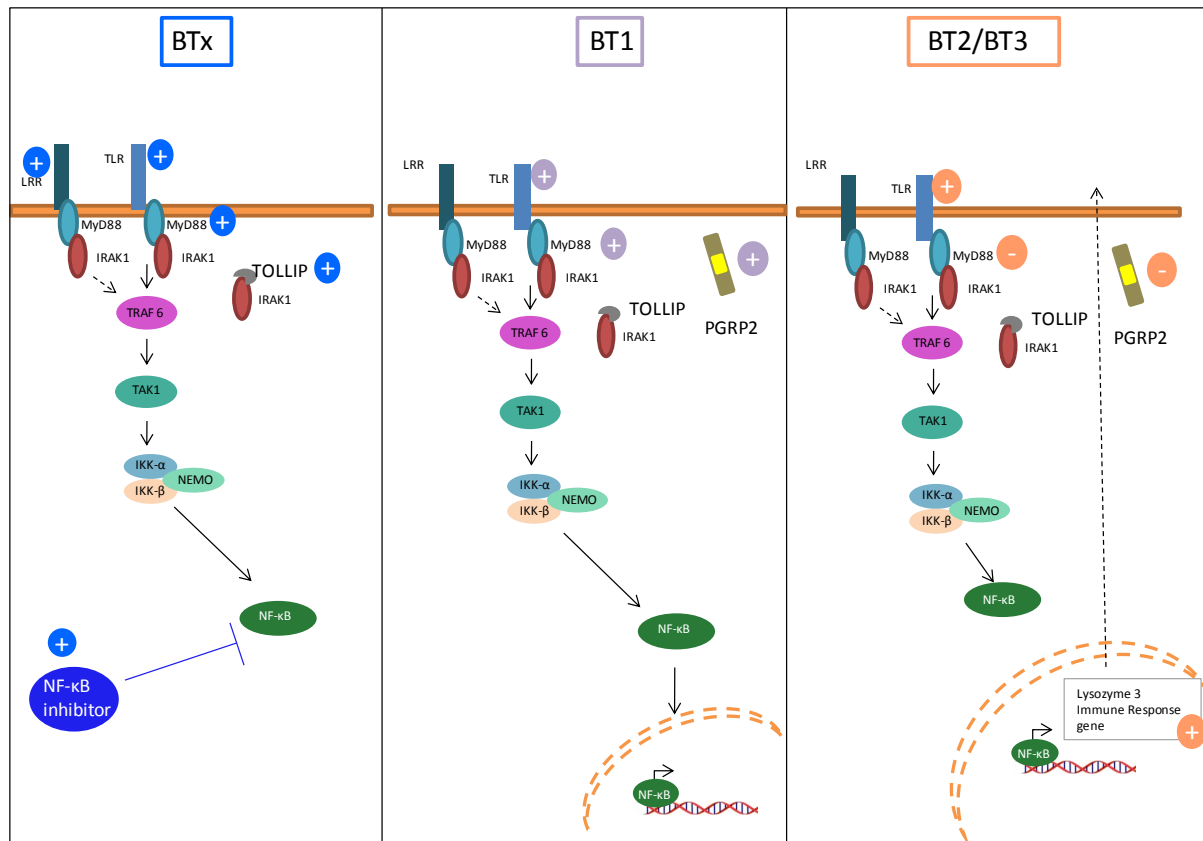


Figure 3.23: Schéma simplifié des gènes impliqués dans l'immunité chez *B.azoricus*. Les + et - représentent les gènes sur et sous-exprimés dans les conditions BTx, BT1, BT2/BT3.

Ces résultats au niveau transcriptomique suggèrent une activation sur le basalte du système immunitaire impliquant les voies Imd et Toll en BT1 et principalement la voie Toll en BT2/BT3. La surexpression de la synthèse de peptides et protéines impliquées dans l'immunité n'est observable qu'en BT2/BT3, suggérant une nécessité pour l'organisme affaibli dans ces deux conditions de combattre des pathogènes et/ou de se débarrasser des bactéries symbiotiques devenues inutiles (i). Cependant, dans les différentes conditions basales, ce ne sont pas les mêmes récepteurs Toll qui sont différentiellement exprimés suggérant des voies de régulation différentes (Wang et al., 2009).

Qu'en est-il des données protéomiques ? Sont-elles corrélées aux résultats transcriptomiques ? Les données protéomiques montre une surexpression de la protéine PGRP2 seulement dans la population naturelle, aucun récepteur de la voie Toll n'a été identifié comme différentiellement exprimé entre les conditions basales et population naturelle. La PGRP2 est aussi surexprimée au niveau transcriptomique dans les conditions population naturelle et BT1. Ces résultats semblent indiquer un rôle de la PGRP2 dans le maintien des symbiotes, puisque lors d'une perte symbiotique importante, celle-ci est sous-exprimée aux niveaux

transcriptomique et protéomique (ii). Cette hypothèse pourra être confirmée ou infirmée par l'étude des conditions TR1.2 et TR1.3. De plus, il est intéressant de noter que les résultats de protéomique montrent en BT3 la surexpression du lysozyme 3 ainsi que d'une lectine de type C, ce qui renforce l'hypothèse développée plus haut (i).

### 5.2.2. Maintien de la charge symbiotique

Dans ces conditions, seules les données de protéomique sont disponibles à ce jour (Figure 3.24). En TR1.2, après 13 jours de retour sur site, la voie Toll semble inhibée, comme l'atteste la surexpression de TOLLIP et de l'inhibiteur de  $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ . Cela semble être aussi le cas en TR1.3, mais dans cette condition la surexpression du peptide antimicrobien Big Defensin 3 suggère l'activation en amont d'une voie de l'immunité menant à la synthèse de peptides antimicrobiens. L'hypothèse (ii) semble recevable en TR1.3 puisque nous observons la surexpression de la PGRP2 après 20 jours de retour sur la moulière. De plus, la surexpression du lysozyme 3 et de la Big Defensin 3 semblent indiquer, comme en BT3, une nécessité pour l'organisme de combattre des bactéries pathogènes ou de réguler ses propres symbiotes.

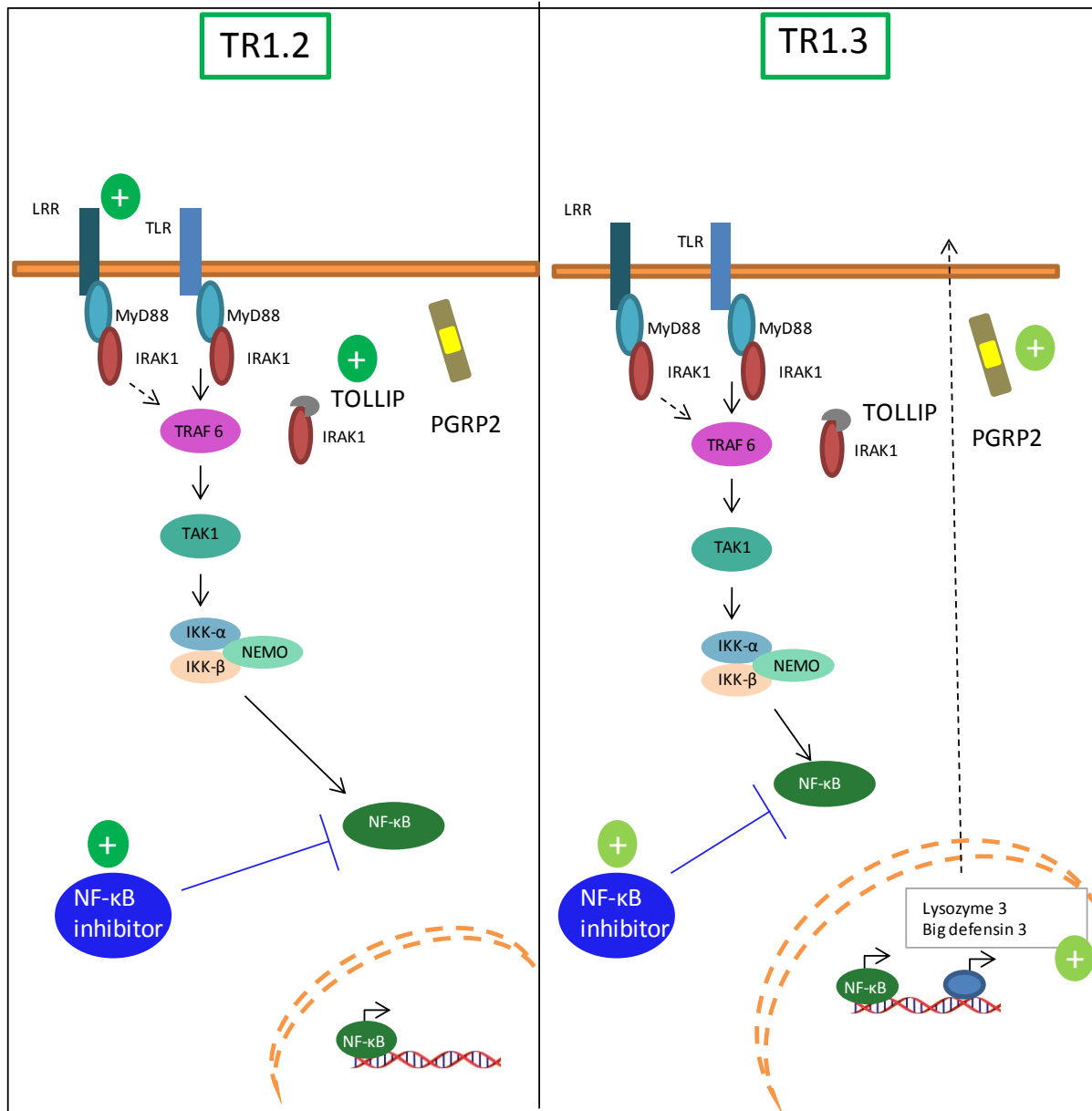


Figure 3.24 : Schéma simplifié des protéines impliquées dans l'immunité chez *B.azoricus*. Les + représentent les protéines surexprimées dans les conditions TR1.2 et TR1.3 comparé à BT1.

### 5.3. Impact sur l'apoptose

La figure 3.25 résume les gènes sur et sous-exprimés dans les trois comparaisons au niveau transcriptomique. Nous observons une surexpression globale des gènes impliqués dans les processus apoptotiques. La comparaison BTx vs population naturelle indique un équilibre à ce niveau entre processus pro et anti-apoptotiques. Cependant, en BT1 la surexpression de p53, de FAS et de TNFR7 ainsi que de la caspase 3 tend à suggérer une activation de l'apoptose dans cette condition. De même, en BT2/BT3, la surexpression de ligands associés aux

récepteurs membranaires ainsi que d'un initiateur de caspase et de la caspase 3 suggèrent l'entrée en apoptose de certaines cellules des conditions BT2/BT3 *via* le mécanisme extrinsèque.

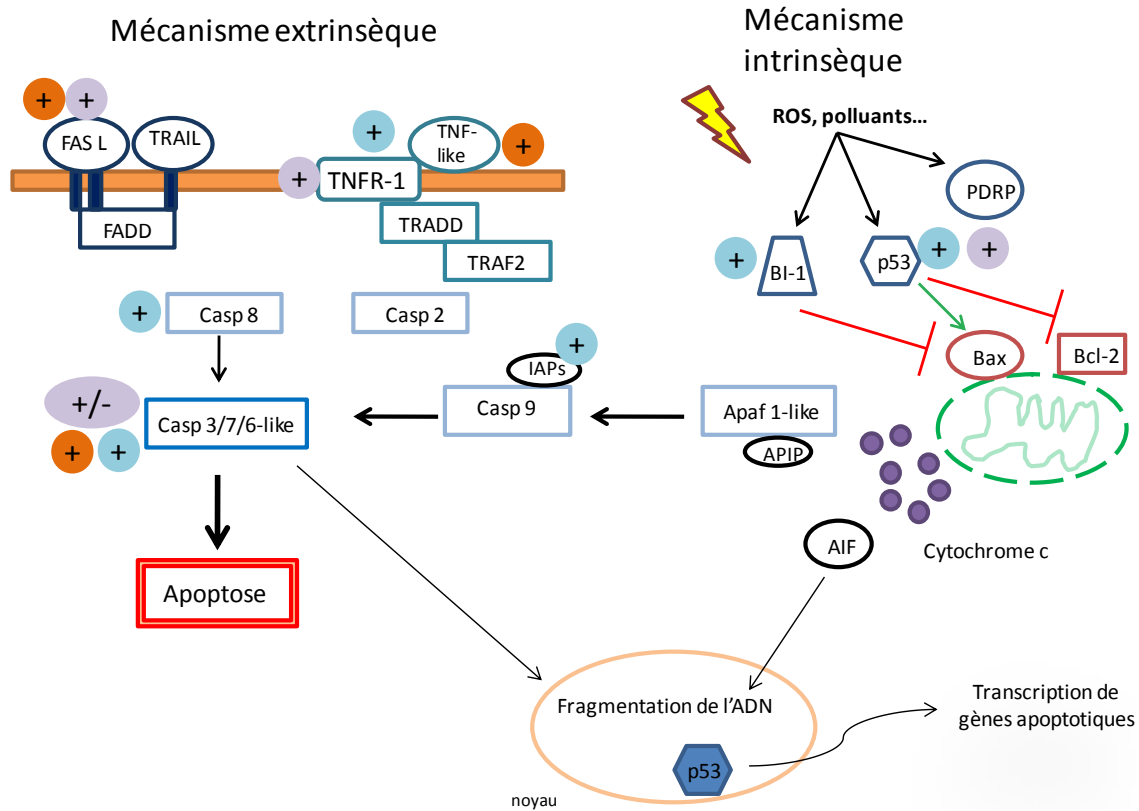


Figure 3.25 : Schéma des protéines impliquées dans l'apoptose chez *B. azoricus* ( adapté de Romero et al 2015 chez *M. galloprovincialis*). Les + et - représentent les gènes sur et sous-exprimés dans les conditions basales (bleu), BT1 (violet), et BT2/BT3 orange

Ainsi à l'échelle transcriptomique les données laissent penser que la perte de symbiotes, et le stress qui y est associé induisent l'entrée de certaines cellules branchiales en apoptose.

Qu'en est-il au niveau protéomique ? Et quel est l'impact du maintien de la charge symbiotique sur les mécanismes apoptotiques ?

La figure 3.26 montre des résultats bien différents de ceux observés en transcriptomique. En BT1, notamment, la sous-expression d'une caspase et d'une protéine à « Death Domain », ne vont pas dans le sens de l'activation de processus apoptotiques. En BT2 et BT3 par contre, la surexpression de caspases va dans le sens des données transcriptomiques, à savoir une induction des processus apoptotiques. Cela semble être aussi le cas en TR1.2. Nous pouvons alors formuler l'hypothèse (iii) selon laquelle la mise sur le basalte et la perte massive de symbiotes induisent une entrée en apoptose de certaines cellules afin de se débarrasser des

cellules contenant des symbiotes partiellement dégradés ou non fonctionnels. Il est de même possible que la remise sur site induise un stress et un remaniement de la symbiose en TR1.2.

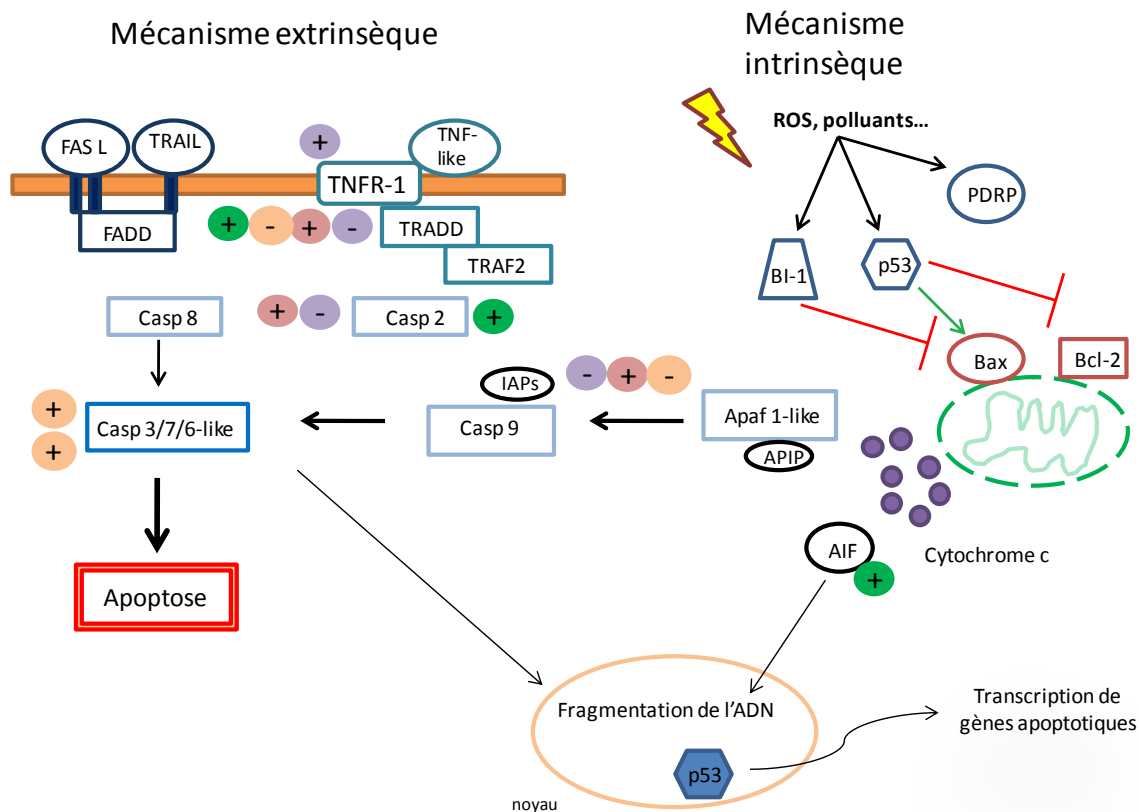


Figure 3.26 : Schéma des protéines impliquées dans l'apoptose chez *B.azoricus* ( adapté de Romero et al 2015 chez *M.galloprovincialis*). Les + et – représentent les protéines sur et sous-exprimées dans les conditions BT1 (violet), et BT2 (rose), BT3 (orange), TR1.2 (vert foncé).

#### 5.4. Remarques finales et hypothèses

Plusieurs hypothèses concernant les acteurs impliqués dans la perte et le maintien de la symbiose ont été formulées à partir des données de protéomique et de transcriptomique.

La mise sur le basalte diminue l'accès aux composés réduits présents dans le fluide, ainsi qu'aux nutriments. Ceci induit un jeûne à la fois chez l'hôte et le symbiote. Ce jeûne mène à une augmentation du métabolisme des symbiotes restants, et à une diminution de celui de l'hôte. L'augmentation en BT2 serait alors due à la digestion par l'hôte d'une grande partie des symbiotes qui deviendraient sur le basalte sa source principale de nutriments (1). La trop faible quantité de symbiotes en BT3 ne serait plus suffisante pour l'hôte menant à une dépression métabolique (2). Nous pouvons supposer que cette digestion se fait grâce à des effecteurs de l'immunité notamment les lysozymes, ou autres PAMs. En conséquence de cette utilisation de bactéries SOX comme source de nutriments, nous pouvons supposer que les

bactériocytes n'accueillent plus ou très peu de bactéries symbiotiques, ce qui mène l'organisme à la destruction de ces cellules devenues superflues (3), expliquant l'induction de processus apoptotiques dans ces conditions. Il semblerait ainsi qu'en période de jeûne prolongé, chez *B. azoricus*, les processus métaboliques, de digestion et d'immunité soient effectivement étroitement liés. De plus, la voie Toll étant prépondérante en basale et non-induite dans la population naturelle et les transloqués, celle-ci pourrait avoir un rôle dans la perte des symbiotes et dans l'induction de la lyse de ceux-ci (4). Inversement la PGRP2 qui est surexprimée dans les conditions population naturelle et TR1.3 ce qui suggère l'implication au moins de cette PGRP, et donc de la voie Imd dans le maintien de la charge symbiotique (5). Rappelons cependant que ces deux voies sont impliquées dans des mécanismes de défense contre les pathogènes et pourraient également être induites dans les différentes conditions dans ce but. En effet, la synthèse de protéines et peptides antimicrobiens en BT3 et TR1.3 pourrait être un mécanisme de défense de l'hôte face aux bactéries du milieu (6). Enfin l'induction de processus apoptotiques en TR1.2 et non en TR1.3 pourrait être due à un remaniement cellulaire de l'épithélium branchial de *B. azoricus* suite au changement d'environnement et de statut symbiotique (7).

L'intégration des données à différents niveaux nous semble primordiale pour tenter de comprendre au mieux la réponse complexe de l'holobionte. Nous nous sommes cependant rendu compte de la faible corrélation entre les résultats obtenus à l'échelle du transcrit et à l'échelle de la protéine, notamment en ce qui concerne les protéines du métabolisme. Cette faible corrélation peut-être due à de nombreux facteurs tels que l'efficacité de la traduction (densité et abondance des ribosomes), la demi-vie des protéines, la séquestration ou non-traduction des ARNms, etc (Hegde et al., 2003; Maier et al., 2009). Nos hypothèses, reposant néanmoins sur les données transcriptomique et protéomique restent très fragiles et nécessitent des études plus ciblées et plus détaillées des différents processus impliqués.

De plus, dans cette étude nous nous sommes intéressés aux acteurs directs des différents processus étudiés. Cependant au sein d'une cellule voire d'un tissu ou d'un organisme, une voie de signalisation peut-être régie par de nombreux régulateurs extérieurs ou non. Ainsi, il a été démontré chez l'homme une régulation de la voie Toll *via* des tyrosines kinases, phosphatases et glucocorticoïdes. C'est le cas pour la Bruton's tyrosine kinase (btk) qui en phosphorylant la sous-unité p65 du complexe NF- $\kappa$ B, promeut la transcription de gènes tandis que la tyrosine phosphatase SHP1 inhibe l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (O'Neill, 2008). Même si de tels mécanismes ne sont pas encore explorés et établis chez les bivalves, l'étude du

protéome et du transcriptome des branchies de *B. azoricus* nous a permis de formuler des hypothèses que nous pourrions tenter d'infirmer ou de confirmer dans la partie suivante.

Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de la symbiose nous nous sommes intéressés de façon plus précise, à partir des mêmes échantillons exposés aux mêmes conditions, à divers acteurs de l'immunité. Tout d'abord les lysozymes qui sont à la fois impliqués dans la digestion et dans l'immunité nous ont semblé être des candidats intéressants pour examiner l'hypothèse (1). Puis nous nous sommes intéressés aux PGRPs impliqués dans l'hypothèse (5). Enfin nous nous sommes intéressés de façon plus précise, aux mécanismes apoptotiques pour confirmer ou non les hypothèses (3) et (7).





## Chapitre IV

### Impact de la symbiose sur le système immunitaire de *B. azoricus*, approche ciblée

Cette quatrième partie de la thèse constitue la partie ciblée qui découle des résultats obtenus sur le protéome et le transcriptome des branchies de *B. azoricus*. Trois études spécifiques seront présentées ici, sous la forme d'articles soumis ou en cours de préparation. Dans ces trois articles, les individus analysés sont issus des expériences *in situ* présentées dans le chapitre III. Dans un premier temps, nous porterons notre attention sur les lysozymes, famille d'enzymes impliquées à la fois dans la réaction immunitaire et la digestion. Puis, nous nous intéresserons aux PGRPs qui sont des protéines capables de reconnaître et plus rarement de lyser le peptidoglycane de la paroi bactérienne. Et enfin, une étude approfondie sur les gènes pro et anti-apoptotiques sera présentée.

#### I. Implication des lysozymes dans la plasticité de la symbiose

##### Résumé de l'article soumis à Plos One.

Cette partie constitue la première approche ciblée de ce chapitre. Ici nous nous intéressons à l'implication des lysozymes dans la régulation, le maintien et/ou l'acquisition de la symbiose. Cette étude est basée d'une part sur les résultats rapportés dans le chapitre III, où notamment nous avons observé une surexpression de l'isoforme Ba-lysozyme 3 en condition basale T3 et TR1.3, et d'autre part sur une hypothèse de Broderick (2015) selon laquelle les processus de digestion et d'immunité auraient une origine commune. Les lysozymes sont connus pour être impliqués dans ces deux processus, mais qu'en est-il de leur implication dans la symbiose ? Lorsque les composés réduits utilisés par la bactérie se font rares, l'hôte se débarrasse-t-il de ses bactéries symbiotiques ? Si tel est le cas, s'agit-il de l'activation d'un processus immunitaire, ou de la digestion des symbiotes ?

Pour répondre à ces questions, nous avons dans un premier temps caractérisé *in silico* les six isoformes de lysozymes (appelés Ba-lysozymes) identifiées à partir d'une banque d'EST de *B. azoricus*. Puis, dans un second temps, nous nous sommes intéressés à leur niveau d'expression dans trois tissus : glande digestive, manteau, et branchies. Cette première partie nous a permis d'identifier les isoformes qui seraient exprimées de façon tissu-spécifique. Nous nous sommes ensuite focalisés sur les branchies, tissu symbiotique, où nous avons suivi l'impact de la perte et/ou du maintien des symbiotes sur le niveau d'expression des différentes isoformes. Ceci nous a amené à proposer un lien entre symbiose et niveau d'expression pour trois isoformes de lysozymes.

**Multiple i-type lysozymes in the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* and their role in symbiotic plasticity**

Detree C.<sup>1</sup>, Chabenat A.<sup>1</sup>, Lallier F.H.<sup>1</sup>, Tanguy A.<sup>1</sup>, Mary J<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Equipe ABICE, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

\* Corresponding author

E-mail : jmary@sb-roscoff.fr

Keywords: *Bathymodiolus azoricus*, symbiosis, lysozyme, digestion, immunity

## Abstract

The aim of this study was first to identify lysozymes isoforms in the deep sea mussel *Bathymodiolus azoricus* then to measure their relative expression or activity in different tissue or conditions. *B.azoricus* is a bivalve that lives close to hydrothermal chimney in the Mid-Atlantic Ridge (MAR). They harbour in specialized gill cells two types of endosymbiont (Gram - bacteria): sulphide oxidizing bacteria (SOX) and methanotrophic bacteria (MOX). This association is thought to be ruled by specific mechanisms or actors of regulation to deal with the presence of symbionts but these mechanisms are still poorly understood. Here, we focused on the implication of lysozyme, a bactericidal enzyme, in this endosymbiosis. The relative expression of Ba-lysozymes isoforms and the global anti-microbial activity, were measured in natural population (Lucky Strike -1700m, Mid-Atlantic Ridge), and in *in situ* experimental conditions. *B.azoricus* individuals were moved away from the hydrothermal fluid to induce a loss of symbionts. Then after 6 days some mussels were brought back to the mussel bed to induce a re-acquisition of symbiotic bacteria. Results show the presence of 6 isoforms in *B.azoricus*. In absence of symbionts 3 isoforms are up-regulated while others are not differentially expressed. Moreover the global activity of lysozyme is increasing with the loss of symbionts. All together these results suggest that lysozymes may play a crucial role in symbionts regulation.

## 1-Introduction

*Bathymodiolus azoricus* is a bivalve mollusc of the Mytilidae family that lives around hydrothermal vents on the Mid-Atlantic Ridge (MAR) (Von Cosel et al., 1999). This mussel hosts two types of endosymbiotic  $\gamma$ -proteobacteria, one sulphide-oxidizing (SOX) and one methanotrophic (MOX), in specialized gill cells called bacteriocytes (Cavanaugh et al., 1987, 1992; Fiala-Médioni et al., 2002; Fisher et al., 1987). They provide the host with carbon and energy from the oxidation of reduced compound present in the environment ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$ ). This dual endosymbiosis is characterized by a strong plasticity (De Busserolles et al., 2009) inducing a change in SOX/MOX ratio when the concentration of methane or sulphide changes (Boutet et al., 2011; Colaço et al., 2002; Petersen et al., 2011; Riou et al., 2008) or a loss of symbionts in the absence of reduced compounds (Kádár et al., 2005). The metabolism of these symbiotic bacteria is relatively well understood compared with that of the host (Duperron et al., 2009; Hanson and Hanson, 1996; Kleiner et al., 2012a; Wendeberg et al., 2012). *B. azoricus* is indeed a mixotrophic organism maintaining its heterotrophic filtration capacity together with its chemotrophic symbioses (Page et al., 1990; Le Pennec et al., 1995). Fiala-Médioni and co-authors showed in a congeneric species (*B. thermophilus*, Galapagos Rift), that the assimilation of nutrients from symbionts to host, is largely based on the intracellular digestion of bacteria using the lysosome/lysozyme system (Fiala-Medioni et al., 1994; Jolles et al., 1996). More recently, Broderick (Broderick, 2015) made the general hypothesis that, in metazoans, digestion and immunity could have a common origin. Indeed, many proteins such as proteases, chitinases, antimicrobial peptides or lysozymes are implicated in both processes. In addition, immunity is thought to be crucial in symbiotic associations to recognize, maintain or regulate symbionts population (Chu and Mazmanian, 2013; Nyholm and Graf, 2012; Royet et al., 2011). Lysozymes (EC 3.2.1.17) are described as anti-bacterial proteins that catalyse the hydrolysis of the  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds of heteropolymers of N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine in bacterial cell walls (Chipman et al., 1969; Salton, 1957) and seems to have a role in both immunity and digestion (Cheng, 1983; McHenery et al., 1979; Xue et al., 2007). They are divided in six types called goose type (LysG or g-type), chicken type (LysC or C-type), invertebrate type (LysI or i-type), phage-type, bacterial-type and plant-type lysozymes according to differences in their structure and biological functions (Bachali et al., 2002). I-type lysozymes have only been reported in invertebrates phyla including Annelida (Zavalova et al., 2004), Nematoda (Mallo et al., 2002), Arthropoda (Paskewitz et al., 2008), Echinodermata (Cong et al., 2009), and Mollusca (Matsumoto et al., 2006). Many of the

studies recently conducted on lysozymes in mollusk species focused on their role in immunity but none of them raised the question of their involvement in the management of symbiotic associations. In other symbiotic models such as aphids/*Buchnera*, high levels of lysozyme expression have been reported in bacteriocytes raising the question of the role of lysozymes in the breakdown of the symbiosis and/or the elimination of other microbial intruders (Nakabachi et al., 2005). Within the general frame of our researches on the biology of *B. azoricus*, the main goal of this study was to provide a comprehensive knowledge on the implication of lysozymes in the regulation of the symbiotic association between *B. azoricus* and SOX/MOX bacteria. In this study, we conducted an original *in situ* experiment at Lucky Strike vent site (1700 m depth), consisting in the translocation of mussels away from their native mussel bed to examine the kinetics of symbionts loss, followed after a short period by a return to their original mussel bed to test the possibility of symbionts re-acquisition. Following a characterisation of the different isoforms of lysozymes found in *B. azoricus* transcriptome, we measured their relative expression in different tissues of mussels from natural population and in gills of individuals from *in situ* experiments in relation with their symbionts content.

## 2-Materials and methods

### 2.1 Animal collection: field sample and *in situ* experiments

Deep sea mussels *Bathymodiolus azoricus* were collected from one hydrothermal vent site (Lucky Strike, population of Montsegur, 37°17,286' N, 32°16,530' W; 1700 m depth) located on the Mid-Atlantic Ridge during the BioBaz and MoMARSAT cruises (July/August 2013). The sampling was done using the Remote Operating Vehicle (ROV) Victor 6000 on the Research Vessel “Pourquoi pas?”. Around 30 mussels representing the natural population were collected and placed in hermetic boxes then brought on board within 2 hours. Gills, mantle and digestive gland were immediately dissected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

For *in situ* experiments, between 15 and 30 mussels were put in several wire cages and 5 of them were placed a dozen meters away from the hydrothermal venting area. This condition was called “basalt”. Cages were brought back on board after 6 days (T1), 20 days (T2) and 27 days (T3) on basalt. In addition, after 6 days on basalt (T1), 2 cages were translocated back from basalt to their original mussel bed in the venting area, and brought back to the research vessel after respectively 13 days (TR1.2) and 20 days (TR1.3) on mussel bed. Immediately after collection, gills were dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

### 2.2 Quantification of symbiont content by real-time PCR

Genomic DNA of both mussels and symbiont bacteria was extracted from gill tissue using CTAB extraction procedure (2% CTAB, 1% PVP, 1.4 M NaCl, 0.2%® mercaptoethanol, 100 mM Tris HCl pH8, 0.1mg. mL<sup>-1</sup> proteinase K, 1 mg.mL<sup>-1</sup> egg-white lysozyme). Tissues were incubated for 2h at 60°C for complete digestion. An equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) was then added to the solution and tubes were inverted gently to mix for 5 min. The mix was centrifuged 10 min at 12,000 rpm at 4°C and the supernatant was carefully collected into a new tube, then DNA was precipitated with 2/3 volume of cold isopropanol (1 h at -20°C). The DNA pellet was recovered by centrifugation (12,000 rpm/4°C/20min), washed with 70% cold ethanol, air-dried and re-suspended in 200 µl RNase free sterile water. Quantity and quality of DNA were assessed *via* UV absorbance (OD260/280/230), using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Delaware, USA). The relative quantity of symbionts was estimated by real-time PCR amplification according to the

protocol available in Boutet et al. (2011). All experiments were carried out using the 2× Lightcycler®480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Mannheim Germany), 70 nM of each primer, 2.1 µl of diluted DNA (2.5 ng) in a final volume of 5 µl and PCR were run in Light Cycler 480 machine (Roche Diagnostics, Mannheim Germany). The amplification was carried out in triplicate as follows: initial enzyme activation at 94°C for 15 min followed by 45 cycles of 94°C for 15 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30sec. A 120 bp-fragment of cytosolic malate dehydrogenase gene (MDH) from the host was used as an internal PCR control (Table 1). The relative quantity of SOX and MOX symbiont was estimated by using the comparative Ct method formula:  $RQ = 2^{-\Delta Ct}$ , ( $\Delta Ct = Ct_{16S} - Ct_{MDH}$ ).

### 2.3 Lysozymes characterisation: sequences, structure and phylogeny

The searches for nucleotide and protein sequence similarities were performed with BLAST algorithm (<http://www.uniprot.org/blast/>). The cDNA sequences and deduced amino acid sequences of Ba-Lysozymes were analysed using the Expert Protein Analysis System (<http://www.expasy.org/tanslate/>). Multiple alignments were conducted with the ClustalW program (<http://npsa-prabi.ibcp.fr/>). Signal peptides were predicted by SignalP4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The three-dimensional model of Ba-Lysozyme 2, 4, 5 and 6 were constructed by comparative modelling with Modeller 9v13 program. The structure of the i-type lysozyme isolated from the common orient clam *Metrix lusaria*, cristallized with 3 N-Acetyl-D-Glucosamine (NAG) as substrates (pdb entry : 3AB6), was used as template. One hundred models were generated for each Ba-Lysozyme isoform and their quality assessed using the Modeller Objective Function parameter. The reliability of modelled structures were validated by Ramachandran plot analysis using PROCHECK (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>). A phylogenetic tree of Ba-Lysozymes, based on the alignment of 158 residues within the lysozyme domain, was constructed with Seaview 4.5.4 software using the neighbor-joining (NJ) method with 1000 bootstrap resampling of the data set.

### 2.4 Lysozymes expressions: RNA extraction and qPCR

The mRNA expression of lysozymes isoforms was analysed by real-time PCR. Gene sequences were collected from available *B. azoricus* libraries (Tanguy et al., 2008) and non-published sequence datasets. Total RNA was extracted from mussel gills, digestive gland and mantle by using Tri-Reagent (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Both



quantity and quality of RNA were assessed via UV absorbance (OD<sub>260/280/230</sub>) using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Delaware, USA). Two µg of total RNA were reverse transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Promega), an anchor-oligo(dT) primer (5'-CGCTCTAGAACTAGTGGATCT.3') and random hexamers (Promega). A volume of 2 µl of each diluted reverse transcription product (1:200) was subjected to real-time PCR in a final volume of 5 µl containing 40 nM of each specific primer and 2×Lightcycler®480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Mannheim Germany). The amplification was carried out as follows: initial enzyme activation at 95 °C for 15 min, then 45 cycles of 95 °C for 10 sec and 60 °C for 30 sec. A dissociation curve was generated and PCR efficiency was estimated for each primer pair. All primer pairs tested generated a single peak in the dissociation curve and a PCR efficiency of 95 to 100%. Relative expression of each gene (fold-change to control) was calculated according to comparative Ct method using the formula:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$  (with  $\Delta C_{t_{geneX}} = C_{t_{GeneX}} - C_{t_{RiboL15}}$ ;  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{geneX}} - \text{mean}\Delta C_{t_{geneX}}$ ). A fragment of ribosomal protein L15 gene (RpL15) from the host was used as the internal PCR control (Table 1). We validated the RpL15 after having observed very low (less than 5%) variation of its expression in all samples (both experimental and field individuals) for gill tissue.

## 2.6 Lysozyme activity

Lysozyme activity was determined according to the method of Shugar (Shugar, 1952). Briefly, frozen gills were crushed in 150µl of PBS at room temperature (0.1M, pH7.2) followed by sonication and centrifugation (5000g/15min/4°C). The supernatant containing proteins was kept and pellet was discarded. The protein concentration was determined using the Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad, Marnes –la-Coquette, France). A suspension of *Micrococcus lysodeikticus* (2.5mg/mL) was prepared in PBS (0.1M, pH7.2). The assay was done in a 96-well microplate where 30 µL of sample was added to 170 µL of bacterial suspension. After 10 minutes, absorbance at 600nm was recorded at 20°C on the Xenius Safas™ spectrophotometer. Egg-white lysozyme was used for standard curve. All measurements of lysozyme activity were done in triplicate.

## 2.5 Statistical analysis

Data from quantitative real-time PCR experiments were analysed with a Kruskal-Wallis test GraphPad Prism, USA( [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) followed by a Dunn's Multicomparison Test. For

tissue specificity, an One way analysis of variance test was performed followed by a Turkey post test. Differences were considered statistically significant when  $P \leq 0.05$ .

### 3- Results and discussion

#### 3.1 Characterisation and phylogenetic position of Ba-lysozymes among bivalve homologs

The analysis of the EST database of *Bathymodiolus azoricus* revealed the existence of six isoforms of lysozymes, referred Ba-Lysozymes 1 to 6. The six lysozymes contain 88 to 201 residues (Fig 1, Table 2) with a pI ranging from 4.24 to 8.96. This large range of pI was also observed in i-types lysozymes from the oyster *Crassostrea virginica* by Xue *et al.* (Xue *et al.*, 2004) who suggested that the varying pI values could be linked to different functions. Indeed, in 2007 Xue *et al.* (Xue *et al.*, 2007) stipulated that lysozymes that contain less protease-cutting sites and lower pI values could be associated with a digestive function as shown in other species (Jolles *et al.*, 1989; Stewart *et al.*, 1987). In their mature form, the Ba-Lysozymes contain 6 to 20 cysteine residues. All the isoforms shared a high similarity with lysozymes from others bivalves and shared the essential amino acids residues characteristic of i-type lysozymes. Ba-Lysozymes 1, 3 and 6 have a core of identical amino acid sequence except for one position (145 in Fig. 1). However, Ba-Lysozymes 1 and 3 have an N-terminal extension of 27 and 52 residues respectively, constituting part of a signal peptide, and share one motif (MSPR/LVYLVLLLPFMSQV). Moreover Ba-Lysozyme 1 contains an additional internal sequence of 63 residues composed of the repetition of the flanking regions (Fig 2). With the exception of Ba-Lysozyme 6, all the isoforms present a signal peptide (16 to 24 residues). For Ba-Lysozyme 1, 2, 3, 4 and 6 the amino acids residues important for the lysozomal activity (substrate binding and catalysis) are conserved (Fig 1) (Kuwano *et al.*, 2013). Ba-Lysozyme 5 is shorter in C-terminal, and two residues implicated in substrate binding are missing. Ba-Lysozyme 2 presents two residues (Ser82 and His115) which, according to Kuwano *et al.* (Kuwano *et al.*, 2013) could confer to this isoform a destabilase activity. Moreover, Ba-Lysozyme 2 presents two lysines which may be involved in its dimerization, as was described for *Tapes japonica* i-type lysozymes (Goto *et al.*, 2007). Structure prediction suggests that Ba-Lysozymes 1, 2, 3 and 4 contain 6 disulfide bridges, Ba-Lysozyme 6 contains 5 disulfide bridges whereas Ba-Lysozyme 5 contains only 2 (Fig. 3). The phylogenetic tree of bivalve i-type lysozymes is similar to that published by Xue *et al.* [38] with, however, the presence of an additional clade of new divergent lineages specific to Mytilidae. This either suggests that a lysozyme ancestral gene might have duplicated very

early in the long history of mytilids or has been secondarily lost in the other bivalves. Globally, the tree shows the co-occurrence of eight lysozyme paralogous lines, some of which being more specific of oysters and others of mussels with the six Ba-Lysozymes only clustering within three of them (Fig 4). According to the tree, the isoforms Ba\_LYS1, LYS3 and LYS6 are nearly identical and could represent allelic forms of the same gene whereas only one orthologous form has been detected in *Bathymodiolus thermophilus*. However, genotyping these three isoforms by quantitative PCR in several individuals indicated that they are all present within each individual (see below). This suggest that these three isoforms recently (after speciation) emerged by a duplication event. Moreover, the three isoforms also diverged by the length of the peptide signal (Fig 1) suggesting different functions.

Interestingly, we only identified i-type lysozymes in the hydrothermal mussel when other mussel species such as *M. galloprovincialis* exhibits the three i-, g- and c-type lysozymes (Bachali et al., 2002; Wang et al., 2012b, 2013). C-type lysozymes remain less described in mollusk species with two in *M. galloprovincialis* and in the clam *Cyclina sinensis* (Pan et al., 2015), and one in the abalone *Haliotis discus hannai* (Ding et al., 2011). Moreover c-type lysozymes have not be detected in the *Crassostrea gigas* genome and they are also absent from the phylum of Echinodermata and Urochordata (Callewaert and Michiels, 2010).

G-type lysozymes have been identified in urochordate (Nilsen et al., 2003) and several mollusc species such as Zhikong scallop (Zhao et al., 2007), Japanese scallop (He et al., 2012), the abalone (Bathige et al., 2013), and mussel (Wang et al., 2012b).

### 3.2 Tissue specificity of Ba-lysozyme isoforms

The tissue-specific expression pattern of the six *B. azoricus* lysozyme isoforms has been investigated by qPCR in three tissues (gill, digestive gland and mantle) in mussels from the natural population. Three Ba-lysozymes isoforms showed a significant differential expression between tissues (Figure 5). Ba-lysozyme 3 appears to be up regulated in gills compared to digestive gland, whereas Ba-lysozyme 2 and Ba-lysozyme 6 are down regulated in gills compared to the two other tissues. In addition, Ba-lysozyme 2 exhibits a similar relative expression in both mantle and digestive gland, and Ba-lysozyme 3 expression is also similar in gills and mantle. Moreover, Ba-lysozyme 6 is significantly more expressed in the mantle than in digestive gland. Even if significant, ratios of expression between tissues remain relatively weak (no more than 3 fold). Interestingly, we observed a distinct tissue expression pattern between the Ba-lysozymes 1, 3 and 6 when these three sequences are almost identical with the exception of their signal peptide and large amino acid insertion in the Ba-lysozyme1

(Fig. 2). These amino acid differences might confer them different functions, which could explain their distinct tissue expression. The detection of a differential tissue expression pattern in the lysozyme family has been described in several other bivalve mollusc species: the pearl mussel *Hyriopsis cumingii* (Ren et al., 2012), the Pacific oyster *C. gigas* (Itoh and Takahashi, 2007) and the eastern oyster *C. virginica* (Itoh et al., 2007; Xue et al., 2010).

In *B. azoricus*, the gill tissue is both a first barrier between the organism and the environment, and a symbiotic tissue. Thus, gill cells should be able, at the same time, to fight against pathogens and to allow symbiotic bacteria to penetrate and remain in the bacteriocytes. To further investigate the implication of lysozymes in symbiosis, we analysed the relative expression of the six isoforms in gills of individuals sampled from the natural population (Fig 6). It appears that Ba-lysozymes 3 and 6 have a significantly higher expression in gills compared to Ba-lysozymes 1, 4 and 5. In addition Ba-lysozyme 4 has the lowest expression in gills.

### 3.3 *In situ* experiment: Relative quantification of SOX/MOX content, expression of Ba-lysozymes isoforms and antimicrobial activity

The main goal of the experiment conducted in this study was to provoke a partial loss of symbiotic bacteria by translocating mussels in an area devoid of venting (basalt) and re-expose some individuals to venting on their original location within the mussel bed. SOX and MOX relative quantification was performed on samples from natural population, basalt (BT1, BT2, and BT3) and translocated (TR1.2, TR1.3) to assess the loss, maintenance or re-acquisition of symbionts. MOX symbiont content showed relatively very low values (below 10U) in all mussels from *in situ* population and almost no MOX was detected in experimental samples. Therefore, the MOX content has not been examined in further analysis. The variation in SOX content is presented on Figure 7. The Kruskal-Wallis test does not show significant difference in SOX content between natural population and basalt T1 individuals but a significant decrease of SOX content is observed between natural population, and BT2 and BT3. Moreover, samples from BT2 and BT3 present a significant lower SOX content than those from BT1. In contrast no significant differences were observed between samples from natural population, BT1, TR1.2 and TR1.3. These results reveal a decrease in symbiont content in a time dependent way in individuals kept on basalt, and maintenance of SOX population in gills of translocated individuals (either TR1.2 or TR1.3). Level of both SOX and MOX content observed in the Montsegur population are comparable with those previously observed in other populations from Lucky Strike (Boutet et al., 2011; Guezi et al., 2014) and

are coherent with the general trend observed. Similar transplant experiments were performed previously in *B. thermophilus* in which the loss of symbiont was almost complete after only 12 days (Raulfs et al., 2004). In our case, for *B. azoricus* at Lucky Strike, the loss of symbiont process seems to be slower and not really detectable after 6 days suggesting a resilience in the symbiont degradation process in the absence of gas.

The relative expression of the 6 Ba-lysozymes isoforms was measured by qPCR in gill tissue in all experimental samples. In the first analysis, we compared samples from natural population (LS, Montsegur) with those issued from the basalt (T1, T2 and T3) (Figures 8). Then BT1 samples were compared with translocated samples (TR1.2 and TR1.3) (Figure 9). Isoforms not shown in Figure 8 are not differentially expressed in basalt conditions compared to natural population (Ba-lysozymes 1 and 6). The first observation is a general up-regulation trend in BT1 condition only significant for Ba-lysozyme 3 and 5. After a longer period on basalt (BT2), Ba-lysozyme 3 and 5 are significantly down-regulated compared to natural population while the expression of isoforms 4 is not modified. For Basalt T3, Ba-lysozyme 5 seems to return to a level of expression similar to the one observed in natural population whereas Ba-lysozyme 3 and 4 are up-regulated. Expression of Ba-lysozyme 2 on basalt (BT3) in comparison with natural population is not significantly different due to an important variability of this isoform expression in natural population but it is significantly up-regulated in BT3 compared to BT2. The downward trend of symbiotic charge observed after 6 days on basalt (BT1) seems to induce an increase of Ba-lysozyme 3 and 5 expression. This up-regulation can be due to either a lysis of useless bacteria or a stress response to a changing environment. After 20 days (BT2), with the significant decrease of symbiotic charge, we observed a significant up-regulation of Ba-lysozyme 3 and a significant down-regulation of Ba-lysozyme 5 in comparison with natural population. After 27 days on basalt (BT3), while the symbiotic charge remains low, Ba-Lysozyme 3 and 4 are up-regulated in comparison with natural population. Among these four isoforms, Ba-lysozyme 3 has an interesting pattern as it is up-regulated in the three basalt conditions. Finally, the impact of the loss of symbionts is different in these six isoforms, two are not impacted (1 and 6), three have their expression increased after 27 days on basalt compared to natural population (isoforms 2, 3 and 4), and one return to an expression similar to the natural population (isoform 5).

In the second analysis, individuals from the translocation experiment (TR1.2 and TR1.3) were compared with those from BT1 (Figure 9). Two isoforms were differentially expressed, in this comparison (Figure 9). As previously, only isoforms with significant variation of their expression level are presented. The translocation induces an up-regulation of Ba-lysozyme 3,

6, only significant for 3 (TR1.2). It is followed by a significant down regulation of Ba-lysozyme 3 and 6 compared to TR1.2. Finally in TR1.3, expression level of Ba-lysozyme 3 returns to the level of BT1. These results suggest that Ba-Lysozyme 3 and 6 could be implicated in the loss of symbiont but not in the maintenance of symbiotic content in gills.

Global lysozyme activity was measured in gills from all natural and experimental samples (natural population, BT1, BT2, BT3 and TR1.2 and 1.3) (Figure 10). On the one hand, lysozyme anti-microbial activity increased significantly after 20 and 27 days in samples from BT2 and BT3 with the highest activity in BT2 individuals. The global induction of anti-microbial activity appears to be linked with the loss of symbiont and also with the up-regulation of the three Ba-lysozymes isoforms mentioned earlier, *i.e.* Ba-Lysozyme 2, 3 and 4. On the other hand, no differences of anti-microbial activity were found between BT1 and translocated individuals (not shown).

#### 4 Concluding remarks

In this study we have demonstrated the presence of six isoforms of i-type lysozymes in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. Some of these isoforms were found differentially regulated in different tissues and under different symbiotic state. Ba-lysozyme 6 expression seems specific to the mantle compared to other tissue but its expression in gills is also very high. Ba-lysozyme 3 is an interesting candidate for our study as it is up-regulated in gills compared to other tissues and it has one of the strongest expressions in this tissue compared to other isoforms. Moreover, the loss of symbiont induces an up-regulation of this isoform suggesting its implication in a possible digestion of symbionts. The loss of symbionts induces an up-regulation of two others isoforms (2 and 4) which had a low expression in gills of natural population. In addition, within this tissue, the global anti-microbial activity increased with the loss of symbionts.

Lysozymes are thought to play a key role in symbiosis in invertebrates. In the symbiotic association between the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* and *Buchnera*, Nakabachi and collaborators observed an expression level of lysozyme 156 times higher in bacteriocytes than in the whole body (Nakabachi et al., 2005). More recently, Nishikori and co-authors observed a drastic decrease in *Buchnera* density during stage 1 associated with an increase of the expression of *lysozyme i-1* and an increase of *Buchnera* degradation (Nishikori et al., 2009). In addition, expression of c-type lysozyme, measured during the pre-molt stages of the insect *Riptortus* increased when symbiont population decreased. This expression was found identical in aposymbiotic individuals (Kim et al., 2014) suggesting the implication of lysozymes in symbiont regulation.

Although, we cannot completely exclude that part of the lysosomal activity in the gill tissue could correspond to a contribution of circulating hemocytes (potentially responding to pathogenic bacteria as described in clams, (Allam et al., 2000)), our results strongly support the role of lysozymes in intracellular digestion of symbionts. The digestion could be a way for the host to regulate and eliminate excess bacteria (either in too large numbers or without access to reduced chemicals) but also to have access to a source of nutrient after a long-term starvation (Broderick, 2015). Indeed we observed at a proteomic level (data not shown) a decrease in main metabolic processes, leading to a metabolic depression after 27 days on basalt. Moreover, in another chemoautotrophic endosymbiosis, cytochemical experiment showed a degradation of bacterial cell wall in gills after two weeks of starvation. Authors made the hypothesis that the host uses symbionts as nutrient to survive a hunger crisis (König et al., 2015). All together our results suggest an implication of Ba-Lysozymes in the digestion

of symbionts in *Bathymodiolus azoricus* bacteriocytes, and therefore a potential role in symbiosis. To go further, it would be of particular interest to make a link between the structure and function (immunity, digestion or involvement in symbiosis) of lysozymes by purifying each Ba-lysozyme isoforms and measuring their antimicrobial activity. Moreover ultrastructural experiments and immunogold-labelling on gills of individuals from *in situ* experiments might provide evidences to confirm or not the role of lysozymes in *B.azoricus* symbiosis.



## References

- Allam, B., Paillard, C., and Auffret, M. (2000). Alterations in Hemolymph and Extrapallial Fluid Parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Challenged with the Pathogen *Vibrio tapetis*. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 63–69.
- Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jollès, P., Fiala-Medioni, A., and Deutsch, J.S. (2002). Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J. Mol. Evol.* 54, 652–664.
- Bathige, S.D.N.K., Umasuthan, N., Whang, I., Lim, B.-S., Jung, H.-B., and Lee, J. (2013). Evidences for the involvement of an invertebrate goose-type lysozyme in disk abalone immunity: Cloning, expression analysis and antimicrobial activity. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1369–1379.
- Boutet, I., Ripp, R., Lecompte, O., Dossat, C., Corre, E., Tanguy, A., and Lallier, F.H. (2011). Conjugating effects of symbionts and environmental factors on gene expression in deep-sea hydrothermal vent mussels. *BMC Genomics* 12, 530.
- Broderick, N. a (2015). A common origin for immunity and digestion. *Front. Immunol.* 6, 1–3.
- De Busserolles, F., Sarrazin, J., Gauthier, O., Gélinas, Y., Fabri, M.-C., Sarradin, P.-M., and Desbruyères, D. (2009). Are spatial variations in the diets of hydrothermal fauna linked to local environmental conditions? *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 56, 1649–1664.
- Callewaert, L., and Michiels, C.W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.* 35, 127–160.
- Cavanaugh, C.M., Levering, P.R., Maki, J.S., Mitchell, R., and Lidstrom, M.E. (1987). Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* 325, 346–348.
- Cavanaugh, C.M., Wirsén, C.O., and Jannasch, H.W. (1992). Evidence for Methylotrophic Symbionts in a Hydrothermal Vent Mussel (*Bivalvia: Mytilidae*) from the Mid-Atlantic Ridge. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3799–3803.
- Cheng, T.C. (1983). The Role of Lysosomes in Molluscan Inflammation. *Am. Soc. Zool.* 23, 129–144.
- Chipman, D.M., Sharon, N., Narten, A.H., Danford, M.D., and Chapman, D.M. (1969). Mechanism of Lysozyme Action Lysozyme is the first enzyme for which the relation between structure and function has become clear. *Science* (80-. ). 165, 454–465.
- Chu, H., and Mazmanian, S.K. (2013). Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. *Nat. Immunol.* 14, 668–675.
- Colaço, a., Dehairs, F., and Desbruyères, D. (2002). Nutritional relations of deep-sea hydrothermal fields at the Mid-Atlantic Ridge: a stable isotope approach. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 49, 395–412.

- Cong, L., Yang, X., Wang, X., Tada, M., Lu, M., Liu, H., and Zhu, B. (2009). Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein. *J. Biosci. Bioeng.* *107*, 583–588.
- Von Cosel, R., Comtet, T., and Krylova, E. (1999). *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from Hydrothermal Vents on the Azores Triple Junction and the Logatchev Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *VELIGER*, 1999 218–248.
- Ding, J., Li, J., Bao, Y., Li, L., Wu, F., and Zhang, G. (2011). Molecular characterization of a mollusk chicken-type lysozyme gene from *Haliotis discus hannai* Ino, and the antimicrobial activity of its recombinant protein. *Fish Shellfish Immunol.* *30*, 163–172.
- Duperron, S., Lorion, J., Samadi, S., Gros, O., and Gaill, F. (2009). Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: diversity, function and evolution. *C. R. Biol.* *332*, 298–310.
- Fiala-Medioni, A., Michalski, J., Jollès, J., Alonso, C., and Montreuil, J. (1994). Lysosomic and lysozyme activities in the gill of bivalves from deep hydrothermal vents. *C.R. Acad. Sci. Sci. La vie/Life Sci.* *317*: 239–244.
- Fiala-Médioni, A., McKiness, Z.P., Dando, P., Boulegue, J., Mariotti, A., Alayse-Danet, A.M., Robinson, J., and Cavanaugh, C. (2002). Ultrastructural, biochemical, and immunological characterization of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid-Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Mar. Biol.* *141*, 1035–1043.
- Fisher, C., Childress, J., Oremland, R., and Bidigare, R. (1987). The importance of methane and thiosulfate in the metabolism of the bacterial symbionts of two deep-sea mussels. *Mar. Biol.* *71*, 59–71.
- Goto, T., Abe, Y., Kakuta, Y., Takeshita, K., Imoto, T., and Ueda, T. (2007). Crystal Structure of *Tapes japonica* Lysozyme with Substrate Analogue. *J. Biol. Chem.* *282*, 27459–27467.
- Guezi, H., Boutet, I., Andersen, A., Lallier, F., and Tanguy, A. (2014). Comparative analysis of symbiont ratios and gene expression in natural populations of two *Bathymodiolus* mussel species. *Symbiosis* *63*, 19–29.
- Hanson, R.S., and Hanson, T.E. (1996). Methanotrophic Bacteria. *Microbiol. Rev.* *60*, 439–471.
- He, C., Yu, H., Liu, W., Su, H., Shan, Z., Bao, X., Li, Y., Fu, L., and Gao, X. (2012). A goose-type lysozyme gene in Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*): cDNA cloning, mRNA expression and promoter sequence analysis. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* *162*, 34–43.
- Itoh, N., and Takahashi, K.G. (2007). cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* *148*, 160–166.

- Itoh, N., Xue, Q., Li, Y., Cooper, R.K., and La Peyre, J.F. (2007). cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish Shellfish Immunol.* **23**, 957–968.
- Jolles, J., Jolles, P., Bowman, B.H., Prager, E.M., Stewart, C.B., and Wilson, a C. (1989). Episodic evolution in the stomach lysozymes of ruminants. *J Mol Evol* **28**, 528–535.
- Jolles, J., Fiala-medioni, A., and Jolles, P. (1996). The Ruminant Digestion Model Using Bacteria Already Employed Early in Evolution by Symbiotic Molluscs. *J. Mol. Evol.* **523–527**.
- Kádár, E., Bettencourt, R., Costa, V., Santos, R.S., Lobo-da-Cunha, A., and Dando, P. (2005). Experimentally induced endosymbiont loss and re-acquirement in the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **318**, 99–110.
- Kim, J.K., Han, S.H., Kim, C.-H., Jo, Y.H., Futahashi, R., Kikuchi, Y., Fukatsu, T., and Lee, B.L. (2014). Molting-associated suppression of symbiont population and up-regulation of antimicrobial activity in the midgut symbiotic organ of the *Riptortus-Burkholderia* symbiosis. *Dev. Comp. Immunol.* **43**, 10–14.
- Kleiner, M., Petersen, J.M., and Dubilier, N. (2012). Convergent and divergent evolution of metabolism in sulfur-oxidizing symbionts and the role of horizontal gene transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 621–631.
- König, S., Le Guyader, H., and Gros, O. (2015). Thioautotrophic bacterial endosymbionts are degraded by enzymatic digestion during starvation: Case study of two lucinids *Codakia orbicularis* and *C. orbiculata*. *Microsc. Res. Tech.* **78**, 173–179.
- Kuwano, Y., Yoneda, K., Kawaguchi, Y., Araki, N., and Araki, T. (2013). The Complete Amino Acid Sequence and Enzymatic Properties of an i-Type Lysozyme Isolated from the Common Orient Clam ( *Meretrix lusoria* ). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 2269–2277.
- Mallo, G. V., Kurz, C.L., Couillault, C., Pujol, N., Granjeaud, S., Kohara, Y., and Ewbank, J.J. (2002). Inducible Antibacterial Defense System in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **12**, 1209–1214.
- Matsumoto, T., Nakamura, A.M., and Takahashi, K.G. (2006). Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **145**, 325–330.
- McHenery, J.G., Birkbeck, T.H., and Allen, J. a. (1979). The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **63**, 25–28.
- Nakabachi, A., Shigenobu, S., Sakazume, N., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P., Ishikawa, H., Kudo, T., and Fukatsu, T. (2005). Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium, *Buchnera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5477–5482.
- Nilsen, I.W., Myrnes, B., Edvardsen, R.B., and Chourrout, D. (2003). Urochordates carry multiple genes for goose-type lysozyme and no genes for chicken- or invertebrate-type lysozymes. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2210–2218.

- Nishikori, K., Morioka, K., Kubo, T., and Morioka, M. (2009). Age- and morph-dependent activation of the lysosomal system and Buchnera degradation in aphid endosymbiosis. *J. Insect Physiol.* *55*, 351–357.
- Nyholm, S. V., and Graf, J. (2012). Knowing your friends: invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 815–827.
- Page, H.M., Fisher, C.R., and Childress, J.J. (1990). Role of filter-feeding in the nutritional biology of a deep-sea mussel with methanotrophic symbionts. *Mar. Biol.* *257*, 251–257.
- Pan, B., Ren, Y., Gao, J., and Gao, H. (2015). De novo RNA-Seq Analysis of the Venus Clam, *Cyclina sinensis*, and the Identification of Immune-Related Genes. *PLoS One* *10*, e0123296.
- Paskewitz, S.M., Li, B., and Kajla, M.K. (2008). Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* *17*, 217–225.
- Le Pennec, M., Beninger, P.G., and Herry, A. (1995). Feeding and digestive adaptations of bivalve mollusc to sulphide-rich habitats. *Comp. Biochem. Physiol.* *111A*, 183–189.
- Petersen, J.M., Zielinski, F.U., Pape, T., Seifert, R., Moraru, C., Amann, R., Hourdez, S., Girguis, P.R., Wankel, S.D., Barbe, V., et al. (2011). Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. *Nature* *476*, 176–180.
- Raulfs, E., Macko, S., and Van Dover, C.L. (2004). Tissue and symbiont condition of mussels (*Bathymodiolus thermophilus*) exposed to varying levels of hydrothermal activity. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* *84*, 229–234.
- Ren, Q., Qi, Y.-L., Hui, K.-M., Zhang, Z., Zhang, C.-Y., and Wang, W. (2012). Four invertebrate-type lysozyme genes from triangle-shell pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*). *Fish Shellfish Immunol.* *33*, 909–915.
- Riou, V., Halary, S., Duperron, S., Bouillon, S., Elskens, M., Bettencourt, R., Santos, R.S., and Dehairs, F. (2008). Influence of CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>S availability on symbiont distribution, carbon assimilation and transfer in the dual symbiotic vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeosciences* *5*, 1681–1691.
- Royet, J., Gupta, D., and Dziarski, R. (2011). Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 837–851.
- Salton, M.R.J. (1957). The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bacteriol Rev* *21*, 82–99.
- Shugar, D. (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta* *8*, 302–309.
- Stewart, C.B., Schilling, J.W., and Wilson, a. C. (1987). Adaptive evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters. *Nature* *330*, 401–404.

- Tanguy, A., Bierne, N., Saavedra, C., Pina, B., Bachère, E., Kube, M., Bazin, E., Bonhomme, F., Boudry, P., Boulo, V., et al. (2008). Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene* 408, 27–36.
- Wang, Q., Zhang, L., Zhao, J., You, L., and Wu, H. (2012). Two goose-type lysozymes in *Mytilus galloprovincialis*: possible function diversification and adaptive evolution. *PLoS One* 7, e45148.
- Wang, Q., Wang, C., Mu, C., Wu, H., Zhang, L., and Zhao, J. (2013). A novel C-type lysozyme from *Mytilus galloprovincialis*: insight into innate immunity and molecular evolution of invertebrate C-type lysozymes. *PLoS One* 8, e67469.
- Wendeberg, A., Zielinski, F.U., Borowski, C., and Dubilier, N. (2012). Expression patterns of mRNAs for methanotrophy and thiotrophy in symbionts of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus puteoserpentis*. *ISME J.* 6, 104–112.
- Xue, Q., Hellberg, M.E., Schey, K.L., Itoh, N., Eytan, R.I., Cooper, R.K., and La Peyre, J.F. (2010). A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BMC Evol. Biol.* 10, 213.
- Xue, Q.-G., Schey, K.L., Volety, A.K., Chu, F.-L.E., and La Peyre, J.F. (2004). Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 139, 11–25.
- Xue, Q.-G., Itoh, N., Schey, K.L., Li, Y.-L., Cooper, R.K., and La Peyre, J.F. (2007). A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 82–95.
- Zavalova, L.L., Baskova, I.P., Barsova, E. V., Snezhkov, E. V., Akopov, S.B., and Lopatin, S. a. (2004). Recombinant destabilase-lysozyme: Synthesis de novo in *E. coli* and action mechanism of the enzyme expressed in *Spodoptera frugiperda*. *Biochem.* 69, 776–781.
- Zhao, J., Song, L., Li, C., Zou, H., Ni, D., Wang, W., and Xu, W. (2007). Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the recombinant protein. *Mol. Immunol.* 44, 1198–1208.

### **Acknowledgements**

We would like to thank the crew and pilot of the N/O Pourquoi pas? and the ROV Victor 6000 for their assistance and technical support as well as the chief scientist of the Momarsat 2013 cruise, Jerome Blandin. We also want to thank Celine Wichlacz and Aurélie Tasiemski from the Université de Lille for their help on lysozyme activity measurements and Didier Jollivet for his help on phylogeny. Moreover we are very grateful to the Region Bretagne for funding.

## Tables

Table 1: Primers used in qPCR

Genes	Primers sequence 5'-3'
Cytosolic malate dehydrogenase (host) (MDH)	For: 5'- ATGGAGGAAAGAGATATGGCACTGAGCGT-3' Rev: 5'-TAACATTAAACATAGCCTAGGAACCTAATG-3'
Methanotrophic symbiont 16S (MOX)	For 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' Rev 5'-GCTCCGCCACTAAGCCTATAAATAGACC-3'
Sulphide-oxidizing symbiont 16S (SOX)	For 5'-GAGTAACGCGTAGGAATCTGC-3' Rev:5'-CGAAGGTCTCTCCACTTTACTCCATAGAG-3'
Ribosomal protein L15 (RPL15)	For 5'-TATGGTAAACCTAAGACACAAGGAGT-3' Rev 5'-TGGAATGGATCAATCAAAATGATTTTC-3'
Ba-Lysozyme 1	For 5'- ATGTCTCCTCGAGTTTATTTGGTGTACT-3' Rev 5'- CAACCTGACAGATACAGCTATACAT-3'
Ba-Lysozyme 2	For 5'- TGTGCTAAGGACTATGAATGTTCCAA-3' For 5'- TCCCAATAACCAAGAGTTGTTGGTTT-3'
Ba-Lysozyme 3	For 5'- TGTCAGGTTGAATCGCACTGCCACCCCAT-3' Rev 5'-GGATTTGTACACCCTGCTGGTCCTCCGTT-3'
Ba-Lysozyme 4	For 5'- ATGAAAAAGATGATGATTATTGCAGGAAT-3' Rev 5'- GATTGCACCCATGATGATGACGCGAGTGTG-3'
Ba-Lysozyme 5	For 5'- TGTCTTCAGTGTATCTGTGACGCGGAGAC-3' Rev 5'- TTAGCACACTCCTCAAACTGTTTCCTGG-3'
Ba-Lysozyme6	Rev 5'- GAGACTGTGACTAGAACAGCCAACATTCCT-3' For 5'-TACGCTAGAATGCACAACGGTGGACC-3'

Table 2: Molecular properties of the six lysozymes isoforms of *Bathymodiolus azoricus*

Name	Length	Signal peptide	MW (kDa)*	Theoretical pI*	Cys residues
Ba-Lysozyme 1	201	1-19	22.9/20.7	9.01/8.96	20
Ba-Lysozyme 2	144	1-20	15.9/13.8	7.88/7.60	14
Ba-Lysozyme 3	163	1-24	18.4/15.7	6.10/5.67	15/14
Ba-Lysozyme 4	143	1-22	15.7/13.4	5.8/5.57	13/12
Ba-Lysozyme 5	88	1-21	9.5/7.2	4.55/4.24	9
Ba-Lysozyme 6	111	No	12.5	8.56	13

\*Molecular weight and pI were determined with or without the signal peptide

## Figures

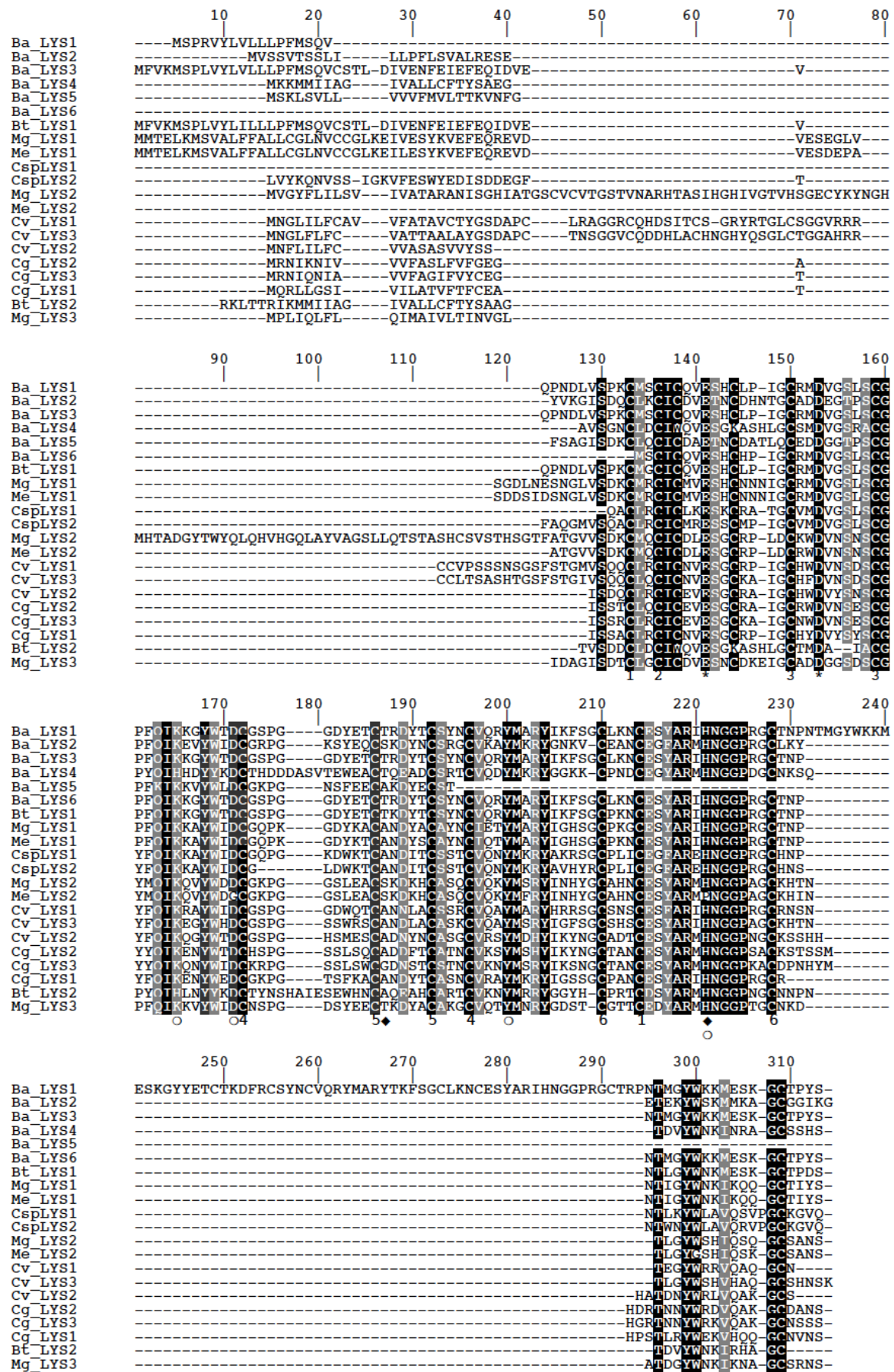




Figure 1: Multiple alignment of Ba-Lysozyme isoforms with other i-type lysozymes from bivalve molluscs. The black and grey regions indicate positions where amino acid residues are conserved or highly similar, respectively. The asterisks indicate the two catalytic residues (141 & 153). Amino acid residues contributing to substrate binding are indicated by empty circles, those contributing to destabilase activity are indicated by black diamonds and those contributing to a potential dimerization are indicated by empty squares. Disulphide bridges and cysteine residues implicated are numbered from 1 to 6.

```

Ba_LYS6      -----MSCICQVE      8
Ba_LYS1      ---MSPRVYLVLLLPFMSQV-----QPNDLVSPKCMSCICQVE 35
Ba_LYS3      MFVKMSPLVYLVLLLPFMSQVCSTLDIVENFEIEFEQIDVEVQPNDLVSPKCMSCICQVE 60

Ba_LYS6      SHCHPIGCRMDVGSLSCGPFQIKKGYWDCGSPGGDYETCTRDYTCSYNCVQRYMARYIK 68
Ba_LYS1      SHCHPIGCRMDVGSLSCGPFQIKKGYWDCGSPGGDYETCTRDYTCSYNCVQRYMARYIK 95
Ba_LYS3      SHCHPIGCRMDVGSLSCGPFQIKKGYWDCGSPGGDYETCTRDYTCSYNCVQRYMARYIK 120
                                     ***** * *****

Ba_LYS6      FSGCLKNCESYARIHNGGPRGCTNP----- 93
Ba_LYS1      FSGCLKNCESYARIHNGGPRGCTNPNTMGYWKKMESKGYETCTKDFRCSYNCVQRYMAR 155
Ba_LYS3      FSGCLKNCESYARIHNGGPRGCTNP----- 145
***** * ##### ***** *

          190      200      210      220
          |        |        |        |
Ba_LYS6      -----NTMGYWKKMESKGCTPYS 111
Ba_LYS1      YTKFSGCLKNCESYARIHNGGPRGCTRPNTMGYWKKMESKGCTPYS 201
Ba_LYS3      -----NTMGYWKKMESKGCTPYS 163
* ***** * #####

```

Figure 2: Amino acid alignment of the Ba-lysozyme 1, 3, 6. The sequences indicated by # and \* are those which are repeated in the internal core sequence of Ba-Lysozyme1.

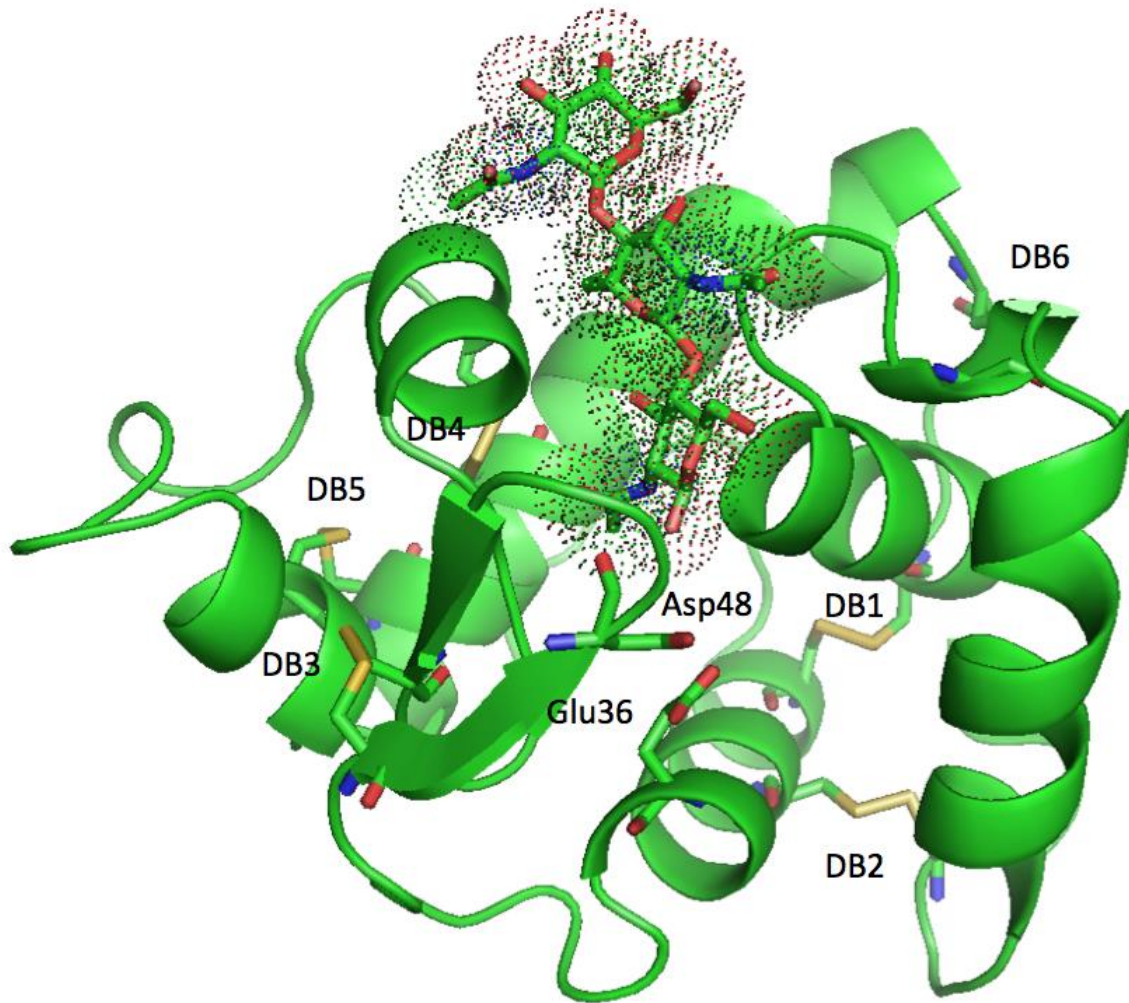


Figure 3 : Ribbon representation of the 3D model of Ba-Lysozyme 4. This model was obtained by homology modeling (Modeller 9v8, Template lysozyme from *Meretrix lusoria*, Code pdb 3AB6). Three NAG units are bound (dots). The two catalytic residues, Asp 48 and Glu36, and the six disulfide bridges (DB 1 to 6) are presented.

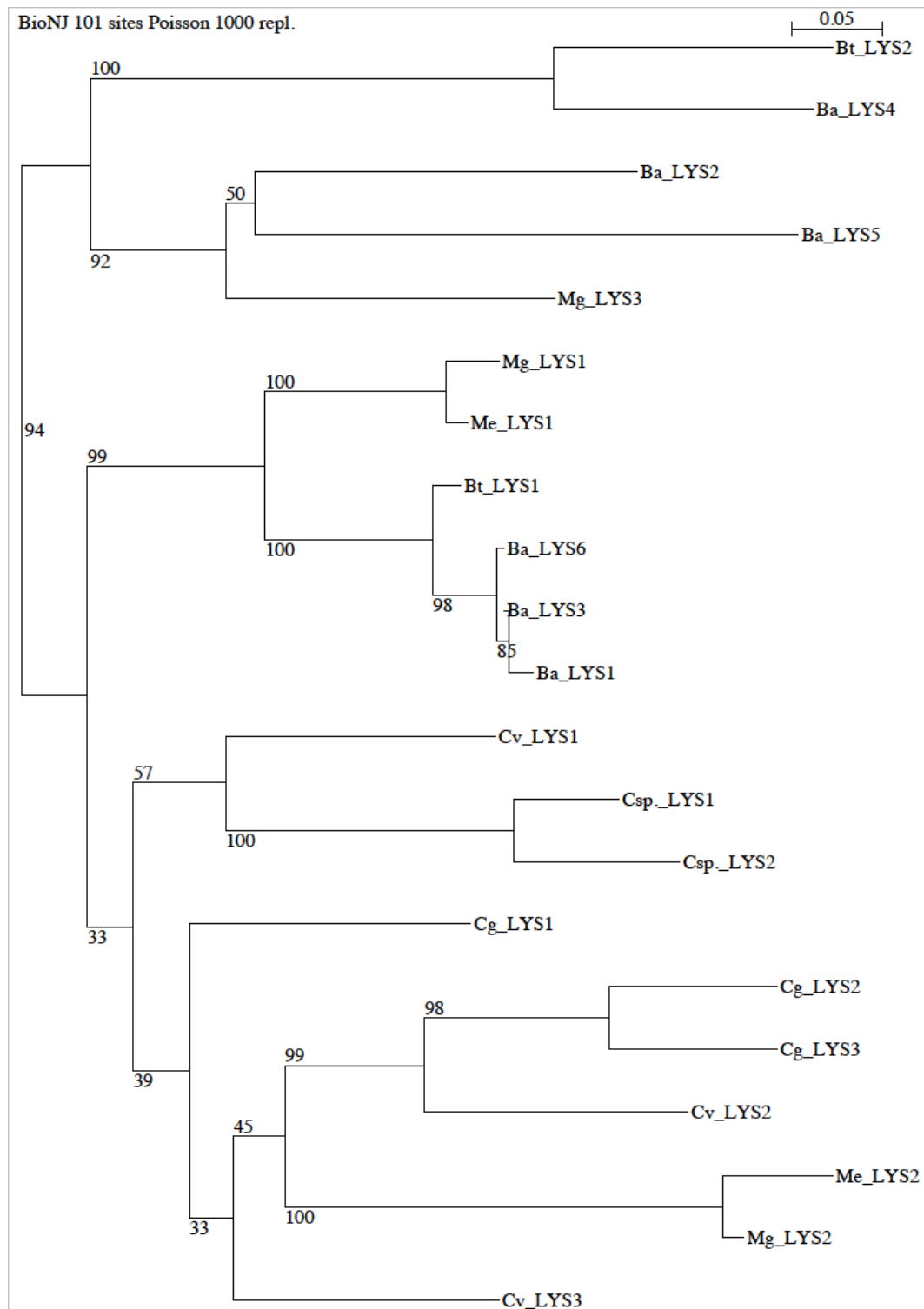


Figure 4: Phylogenetic relationships of i-type lysozymes among bivalve.

The distance tree was obtained by neighbor joining with 1000 bootstrap resampling of the data set (value below the branches, Seaview 4.5.4). The GenBank accession no. and the species are as follows : AF334665 (*Mytillus galloprovincialis*, Mg\_LYS1), AB298451 (*Mytillus galloprovincialis*, Mg\_LYS2), AJQ21515.1 (*Mytillus galloprovincialis*, Mg\_LYS3), AF334662 (*Mytillus edulis*, Me\_LYS1), DQ268868 (*Mytillus edulis*, Me\_LYS2), AB206328

(*Crassostrea virginica*, Cv\_LYS1), AB252064 (*Crassostrea virginica*, Cv\_LYS2), AB427186(*Crassostrea virginica*, Cv\_LYS3), AB179775 (*Crassostrea gigas*, Cg\_LYS1), AB288344 (*Crassostrea gigas*, Cg\_LYS2), AB307634 (*Crassostrea gigas*, Cg\_LYS3), CU994883 (*Crassostrea gigas*, Cg\_LYS4), AF334666 (*Calypotgena sp.*, Csp\_LYS1), AF334667 (*Calypotgena sp.*, Csp\_LYS2), AAN16208 (*Bathymodiolus azoricus*, Ba\_LYS3), AAN16209 (*Bathymodiolus thermophilus*, Bt\_LYS1).

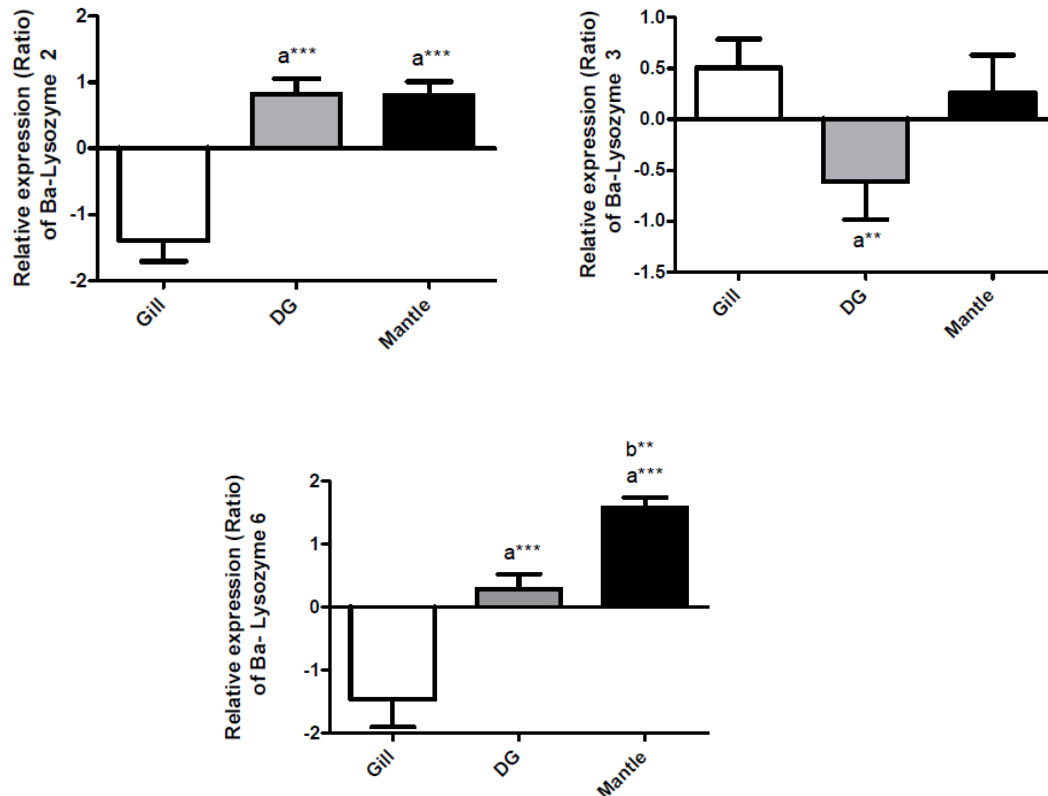


Figure 5: Tissue-specificity of different lysozymes isoforms expression.

Relative expression level of mRNA (Ratio) is indicated for each tissue tested (Gill (n=31) in white, Digestive Gland (n=30) in grey and Mantle (n=32) in black). DG: Digestive gland. a: significantly different from Gill; b: Significantly different from DG (\*: p<0.05, \*\* p<0.001, \*\*\* p<0.0001). (One-way analyse of variance followed by Turkey post test).

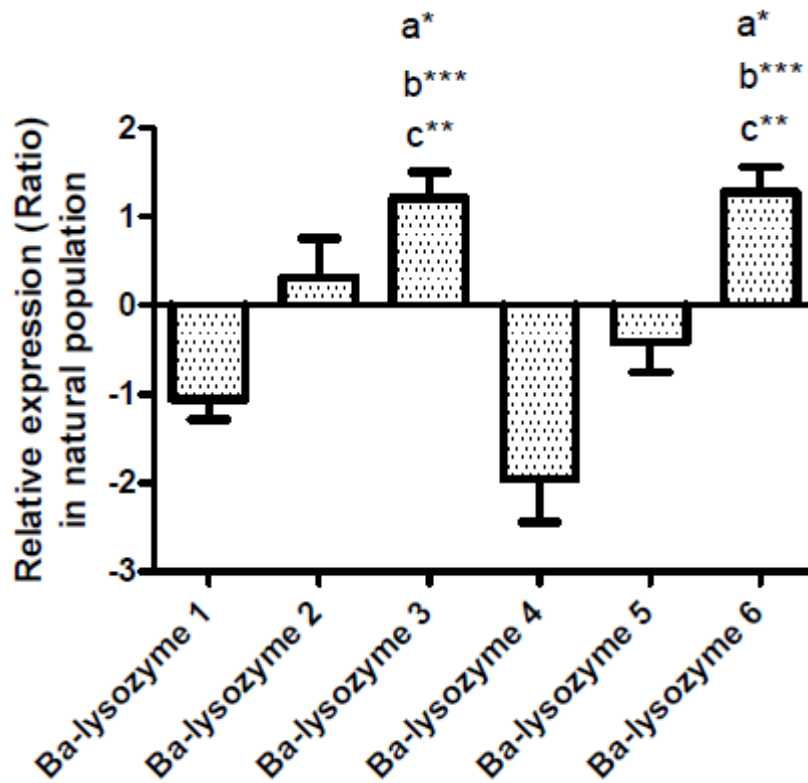


Figure 6: Relative expression level (Ratio) of the six i-type lysozymes in *B. azoricus* gills in natural population (n=31). a: significantly different from Ba-lysozyme 1; b: significantly different from Ba-lysozyme 4 and c: significantly different from Ba-lysozyme 5. (\*:  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ). (Kruskal-Wallis test, Dunns post test).

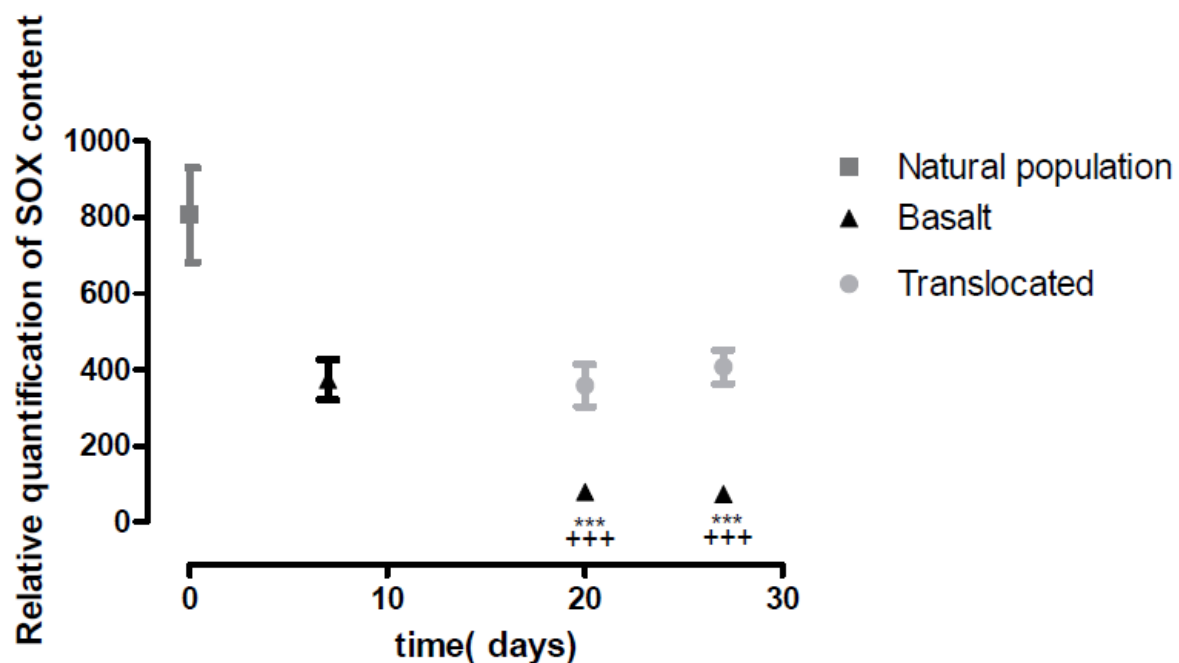


Figure 7: Relative quantification of SOX content in three conditions: Natural population (dark grey), Basalt (T1, T2, T3) (black) and Translocated (grey). \*: significantly different Natural population and +: significantly different from Basalt T1. (\*\*\*) or (+++)  $p < 0.001$ . (Kruskal-Wallis test and Dunns post test).

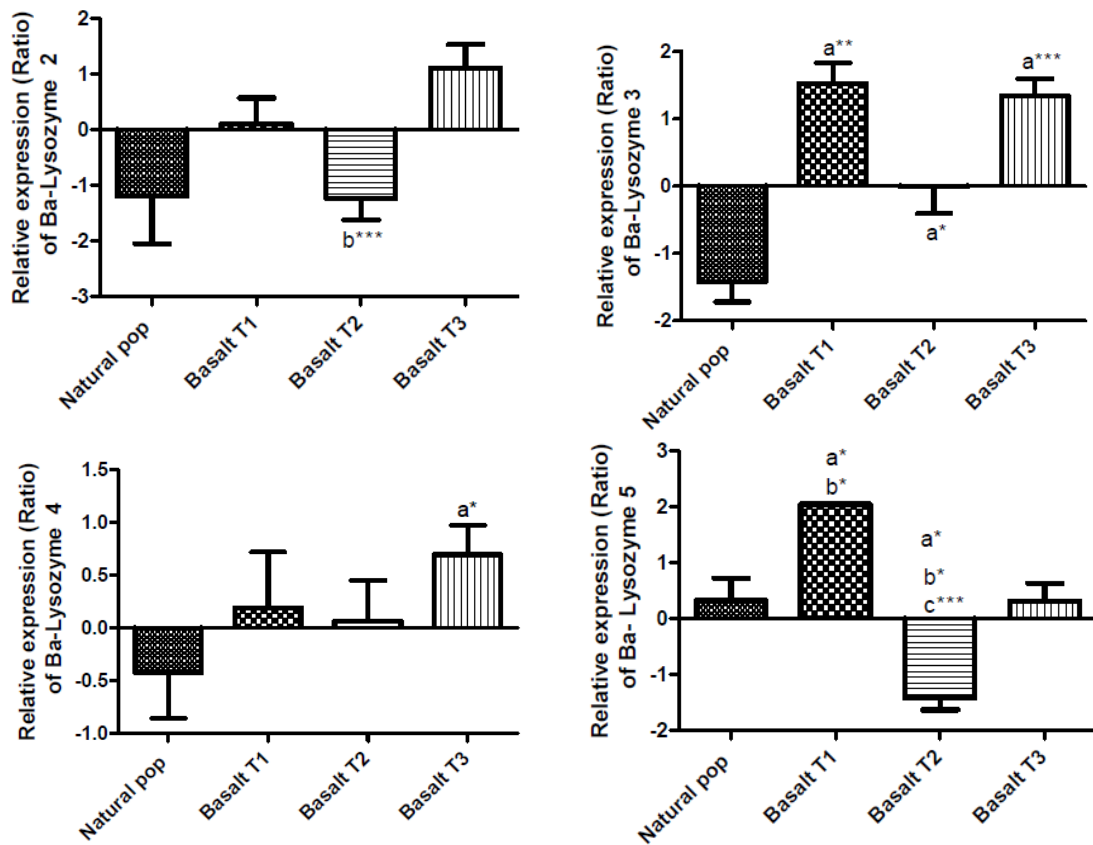


Figure 8: Relative expression of lysozymes isoforms in *B. azoricus* gills in natural population and after symbiont loss.

Relative expression level of mRNA (Ratio) is indicated in: Natural population (n=31), Basalt T1 (n=15), T2 (n=24) and T3 (n=23). a: significantly different from natural population; b: significantly different from Basalt T3; c: significantly different from Basalt T1. (\*:  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ). (Kruskal-Wallis test, Dunns post test).

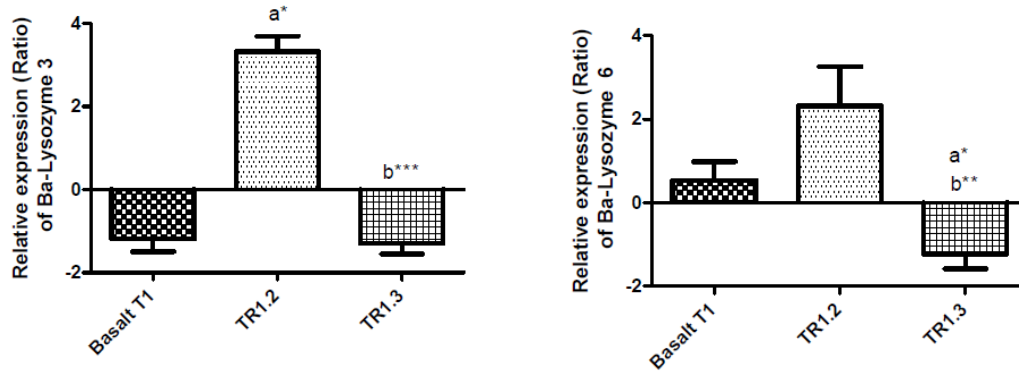


Figure 9: Relative expression of lysozymes isoforms in *B.azoricus* gills after translocation.

Relative expression level of mRNA (Ratio) is indicated for each condition: Basalt T1 (n=15), TR1.2 (n=10) and TR1.3 (n=11). a: Significantly different from Basalt T1; b: significantly different from TR1.2. (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*:  $p < 0.0001$ ). (Kruskal-Wallis test, Dunns post test).



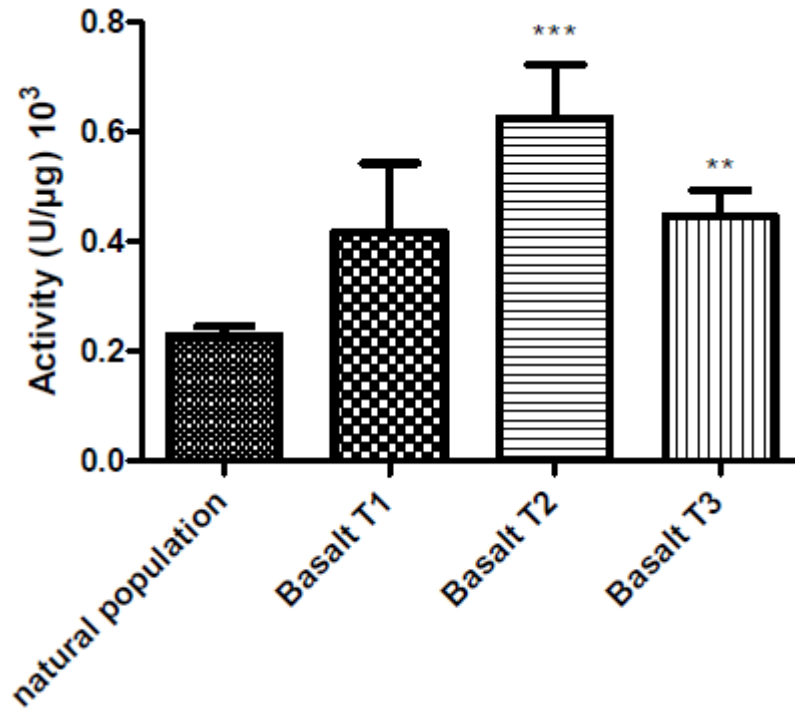


Figure 10: Global lysozyme activity in *B.azoricus* gills in different conditions: Natural population (n=81), Basalt T1 (n=12), T2 (n=21), and T3 (n=15). Lysozyme activity is expressed by units of  $\mu\text{g}$  of proteins. \*: significantly different from natural population.

(\*:  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ). (Kruskal-Wallis test, Dunns post test).



## II. Identification des PGRPs chez *B. azoricus* et leurs rôles dans la symbiose

### Article en préparation

Cette partie constitue la deuxième approche ciblée de notre étude. Ici, nous nous intéressons aux rôles potentiels des PGRPs dans la régulation de la symbiose chez notre organisme d'étude. La genèse de cette étude est l'observation rapportée au chapitre III montrant une surexpression au niveau protéique et au niveau transcriptomique de la PGRP2 chez les individus issus de population naturelle et en TR1.3. Les PGRPs forment une famille de protéines impliquées dans des processus immunitaires tel que la reconnaissance du peptidoglycane des bactéries et dans certains cas leur destruction par lyse de la paroi bactérienne. Les PGRPs sont présentes chez la majorité des animaux à l'exception des « metazoaires inférieurs » tels que les nématodes (Dziarski et al., 2006; Guan and Mariuzza, 2007). Leur implication dans des processus immunitaires chez les insectes, et notamment la drosophile, a été le fruit de nombreuses recherches. Celles-ci ont mené à la découverte de leur implication dans les voies immunitaires principales que sont les voies Toll et Imd (Leulier et al., 2003). Chez les bivalves, les PGRPs ont été identifiées chez plusieurs espèces mais leur lien avec les voies Toll et Imd est encore flou. En effet, malgré la présence d'effecteurs typiques de la voie Imd, la réalité de cette voie chez les bivalves reste encore discutée (Gerdol and Venier, 2015; Toubiana et al., 2014). Le rôle des PGRPs dans la voie Imd laisse supposer qu'elles pourraient jouer un rôle dans des processus de régulation du microbiome. En effet de nombreuses études chez les insectes, mollusques ou invertébrés de façon générale ont démontré une expression des PGRPs en fonction de la présence ou de l'absence de symbiotes dans les cellules, organes ou tissus symbiotiques (Anselme et al., 2006; Nyholm et al., 2012; Troll et al., 2009, 2010; Wang and Aksoy, 2012). Ces caractéristiques font des PGRPs de bons candidats dans la recherche de régulateurs de la symbiose (Reynolds and Rolff, 2008). Dans cette étude nous avons dans un premier temps identifié les différentes isoformes de PGRPs dans le tissu branchial, puis nous avons mesuré leur expression par PCR quantitative dans les différentes conditions expérimentales *in situ*. Cinq isoformes ont été identifiées, dont quatre courtes possédant une activité amidase et une longue. Seules deux de ces isoformes possèdent un peptide signal leur permettant d'être adressé. L'expression relative de ces cinq Ba-PGRPs montre notamment une répression de leur transcription lors de la perte

symbiotique. Les résultats de cette étude suggèrent un rôle des PGRPs dans la régulation de la densité symbiotique et/ou dans la signalisation lors de l'étape initiale de colonisation.

**Identification and expression of multiple PGRPs in the deep sea mussel  
*Bathymodiolus azoricus*, involvement in symbiosis.**

Detree C.<sup>1</sup>, Lallier F.H.<sup>1</sup>, Tanguy A.<sup>1</sup>, Mary J<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Equipe ABICE, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

Keywords: *Bathymodiolus azoricus*, symbiosis, PGRP, immunity

## **Abstract**

The relationship between the deep sea mussel *Bathymodiolus azoricus* and its thiotrophic (SOX) and methanotrophic (MOX) symbiont has been ecologically and functionally well studied. Endosymbiosis is common in deep sea hydrothermal vent, yet little is known about the molecular mechanisms underlying the regulation of interactions between host and symbionts. In this study we concentrated our interest on the implication of the innate immunity of the host in *B. azoricus* symbiosis. We therefore focused on PGRPs shown to be pattern recognition protein recognizing the peptidoglycan of bacterial cell wall. First we characterised the different PGRPs isoforms in *B. azoricus* gills, and then we analysed their relative expression in this same tissue in different symbiotic state. To do so we performed *in situ* experiments where we induced a loss and maintenance of symbiotic population in mussels gills. Five isoforms were identified among which only two has a signal peptide. Real-time PCR quantification of PGRPs isoforms, has shown a decrease of PGRPs expression when symbiont are released. Overall these results suggest an implication of PGRPs in the regulation of symbiosis in *B. azoricus* gills. Secreted proteins could act as a cooperation signal to induce colonisation of symbiotic tissue while non-secreted proteins may regulate the density of endosymbionts within the tissue.

## Introduction

Symbiosis between invertebrates and bacteria are a common feature of chemosynthetic environments (Tunnicliffe 1991; Van dover and Fry, 1994; Dubilier et al., 2008). In particular, around most deep sea hydrothermal vents around the world, bivalves with enlarged gills, a reduced digestive system and symbiotic sulphur-oxidizing and/or methane-oxidizing bacteria are dominant (Miyazaki et al. 2010; Kyuno et al. 2009; Le Pennec et al 1990). In *Bathymodiolus azoricus*, a mussel species from the Atlantic found at vent sites south of the Azores, both types of intracellular gammaproteobacterial symbionts are found within specialised gill cells, the bacteriocytes. Methanotrophic symbionts (MOX) use methane and fix its carbon using energy derived from its oxidation whereas sulphur-oxidizing symbionts (SOX) oxidize hydrogen sulphide to generate energy and fix CO<sub>2</sub> into organic carbohydrates (Cavanaugh et al. 1992; Fiala-Médioni et al. 2002; Duperron et al. 2006; Distel et al. 1995). They receive all metabolites necessary for chemoautotrophy from seawater through the host which is able to maintain a flux usually serving nutrition by filtration in bivalves. This symbiosis is known to be plastic and highly dependent on environmental conditions (Duperron et al. 2006; Boutet et al. 2011; Fiala-Medioni et al. 2002; Salerno et al. 2005; Colaço et al. 2002). Indeed the lack of hydrogen sulphur or methane can lead one or the other type of symbiont to take precedence on the other. Halary and co-authors showed that a high concentration of hydrogen sulphur, in mussels kept in aquaria, induces a higher level of sulphur-oxidizing symbionts in *B. azoricus* gills (Halary et al., 2008). This flexibility is thought to be a host adaptation to cope with its heterogeneous environment. Despite the extensive research done on bathymodiolinae symbiosis, the underlying molecular mechanisms that govern this symbiosis are largely unknown. Specifically, mechanisms involved in the interaction between host and symbiont at the cellular and/or molecular level have not been explored. To date, only a few studies have examined related question through microscopic investigations or gene expression (Barros et al., 2015; Bettencourt et al., 2014; Boutet et al., 2011; Kádár et al., 2005; Won et al., 2003). As in other symbioses, *B. azoricus* may regulate symbionts population through apoptosis or immunological responses. These mechanisms suggest that the host could be able to recognize its symbiont, differentiate them from pathogenic bacteria and influence the proliferation of its symbiont. To further our understanding of the molecular mechanism used by bathymodiolinae to interact with their symbionts, we conducted *in situ* experiments and focused on a family of PRRs (Pattern Recognition Receptors): Peptidoglycan Recognitions Proteins (PGRPs). PGRPs are present

in most animals including insects, echinoderms, molluscs and vertebrates, but not in some other metazoan such as nematodes (Dziarski et al., 2006; Guan and Mariuzza, 2007). PGRPs are innate immunity molecules that contain PGN-binding domain (around 165 amino acids in length) which enable them to recognize and bind the peptidoglycan (PGN) of bacteria cell-wall (Yoshida et al., 1996). A minority of them, called catalytic-PGRPs, possess an amidase activity allowing them to cleave the bond between MurNac and L-ala in PGN (Gelius et al., 2003; Kim et al., 2003; Li et al., 2007; Wang et al., 2003). PGRPs have been well studied in insects in which they are grouped into two classes: short one (S) and long one (L), and can be intracellular, extracellular or transmembrane (Werner et al., 2000). PGRPs are known to be involved in innate immunity in insects and more precisely in two NF- $\kappa$ B signalling pathways: Toll and Imd (Leulier et al., 2003). Indeed, PGRP-SA and PGRP-SC1 recognize PGN of bacteria, activate protease that cleaves an extracellular cytokine-like protein (Spaetzle) which activates the Toll pathway whereas in *Drosophila*, PGRP-LC (a transmembrane protein) is activated by Gram - bacteria or Gram + bacilli which triggers the Imd pathway (Choe et al., 2002; Kaneko et al., 2006; Takehana et al., 2004). Both pathways lead to the production of anti-microbial peptides to fight against pathogenic bacteria. The key role of PGRPs in immunity makes them interesting candidates for studying mechanisms underlying symbiosis. In this study we propose to look at the implication of PGRPs in the breakdown or maintenance of the association between *B. azoricus* and SOX/MOX bacteria. We characterised PGRPs isoforms in gills of *B. azoricus* and then we analysed their expression in different *in situ* conditions corresponding to different symbiotic states. We first induced a gradual loss of symbiont in mussels, and compared expressions of PGRPs in natural population individuals and in individuals with less or a very few symbionts. Then we measured the expression of PGRPs isoforms of individuals that maintain their symbiotic rate as presented in Detree et al 2015.



## Materials and methods

### 2.1. Animal collection: Field sample, *in situ* experiments and quantification of symbionts

Deep sea mussels *Bathymodiolus azoricus* were collected from one hydrothermal vent site (Lucky Strike Montsegur, 1700m in depth) located in the Mid-Atlantic Ridge during the BioBaz and MoMARSAT cruises (july / august 2013). The sampling was done using the Remote Operating Vehicle (ROV), Victor 6000 on the Research Vessel “Pourquoi pas?”. Around thirty mussels representing natural population were collected at the same time on this site, and brought on board. Then gills, mantle and digestive gland were dissected, frozen in nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

For *in situ* experiments, between 15 and 30 mussels were put in several boxes and 5 of these boxes were placed few meters away from the hydrothermal fluid. This condition was called “basalt”. The recovery of these boxes was performed, according to a kinetic going from 6 to 27 days. Boxes were brought back on board in three steps: after 6 days on basalt (T1), 20 days (T2) and 27 days (T3). Moreover, after six days on basalt (T1), two cages were translocated from basalt to mussel bed (next to hydrothermal fluid) and brought back to the research vessel after respectively 14 days (called TR1.2) and 21 days (TR1.3) on mussel bed. Immediately after collection, gills were dissected, frozen in nitrogen and stored at -80°C until further analysis. Then the whole DNA was extracted and the quantification of symbiont was performed by qPCR according to Boutet and co-authors (Boutet et al., 2011). Results are shown in Detree et al 2015.

### 2.2. PGRPs characterisation: sequences, structure and phylogeny

The searches for nucleotide and protein sequence similarities were performed with BLAST algorithm (<http://www.uniprot.org/blast/>). The cDNA sequence and deduced sequence amino acid sequence of Ba-PGRPs were analysed using the Expert Protein Analysis System (<http://www.expasy.org/tanslate/>). Multiple alignments were conducted with the ClustalW program (<http://npsa-prabi.ibcp.fr/>). Signal peptides were predicted by SignalP4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). The three-dimensional model of Ba-PGRP2 and 3 were constructed by comparative modelling with Modeller 9v13 program. The structures of the PGRP-LE, cristallized with the tracheal cytotoxin as substrate (pdb: 2CB3) and the PGRP-SA (pdb: 1sxr), isolated from *Drosophila melanogaster*, were used as template respectively. One hundred models were generated for each PGRPs and their quality assessed using the Modeller Objective Function parameter. The reliability of modelled structures were validated

by Ramachandran plot analysis using PROCHECK (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html>).

### 2.3.PGRPs expressions: RNA extraction and qPCR

The mRNA expression of PGRPs isoforms was analysed by real-time PCR. Gene sequences were collected from available *B. azoricus* libraries (Tanguy et al., 2008) and non-published sequence datasets. Total RNA was extracted from mussel gills, digestive gland and mantle by using Tri-Reagent (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Both quantity and quality of RNA were assessed *via* UV absorbance (OD260/280/230) using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Delaware, USA). Two µg of total RNA were reverse transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Promega), an anchor-oligo(dT) primer (5'-CGCTCTAGAACTAGTGGATCT.3') and random hexamers (Promega). A volume of 2,1 µl of each diluted reverse transcription product (1:200) was subjected to real-time PCR in a final volume of 5 µl containing 40 nM of each specific primer and 2×Lightcycler®480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Mannheim Germany). The amplification was carried out as follows: initial enzyme activation at 95 C for 15 min, then 45 cycles of 95 C for 10sec and 60 C for 30 sec. A dissociation curve was generated and PCR efficiency was estimated for each primer pair. All primer pairs tested generated a single peak in the dissociation curve and a PCR efficiency of 95 to 100%. Relative expression of each gene (fold-change to control) was calculated according to comparative Ct method using the formula:  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$  (with  $\Delta C_{t_{\text{geneX}}} = C_{t_{\text{GeneX}}} - C_{t_{\text{RPL15}}}$ ;  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{geneX}}} - \text{mean}\Delta C_{t_{\text{geneX}}}$ ). A fragment of ribosomal protein L15 gene (RpL15) from the host was used as the internal PCR control (Table 2). We validate the RpL15 after having observed very few (less than 5%) variation in its expression in all samples (both experimental and field individuals) for gill tissue.

### 2.5 Statistical analysis

Data from quantitative real-time PCR experiments were analysed with a Kruskal-Wallis test GraphPad Prism, USA ( [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) followed by a Dunn's Multicomparison Test. For tissue specificity, a One way analysis of variance test was performed followed by a Turkey post test. Differences were considered statistically significant when  $P \leq 0.05$

### 3. Results

#### 1. Characterisation and phylogenetic position of Ba-PGRPs

The analysis of the EST database of *Bathymodiolus azoricus* revealed the existence of five isoforms of PGRPs, referred to as Ba-PGRPs 1 to 5. The five PGRPs are encoded with paralogous genes and contain from 191 to 435 residues (Fig1, Table 2). Ba-PGRPs 2, 3, 4 and 5 are short (S) and contain one PGRP domain whereas Ba-PGRP-1 is a long one (L) with only one PGRP domain also. Ba-PGRP 3 and 5 possess a predicted signal peptide in their N-terminal part indicating that these two isoforms are probably secreted. Interestingly, none of these isoforms possess a transmembrane domain. The sequence analysis suggests that Ba-PGRP 2 and 5 specifically recognized DAP-type peptidoglycan (Gram - bacteria and Gram + bacilli), residues responsible for the binding selectivity being conserved (Gly441, Trp442 and Arg461 in human PGRP 2) (Fig. 1) (Lim et al., 2006; Swaminathan et al., 2006). For the three others (Ba-PGRP 1, 3 and 4), the arginine residue is the only one conserved suggesting that they may be able to recognize other domains. The presence of four conserved Zn<sup>2+</sup>-binding amino acids (His411, Tyr447, His522 and Cys530 in human PGRP 2) in the four short isoforms could confer them an amidase activity (*N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase) (Kim et al., 2003). In the long isoform, Ba-PGRP 1, the cysteine residue is replaced by a glycine. This kind of mutation was already observed in human, leading to a loss of amidase activity (Michel et al., 2001; Wang et al., 2003), but also in *Drosophila* leading to an abolishment of its ability to activate the Toll pathway. Structure prediction and sequence alignment suggest that the four short isoforms, Ba-PGRPs 2 to 5 contain one disulfide bridge, (Fig. 2).

#### 2. Relative expression of Ba-PGRPs in natural population and *in situ* experiments

The relative expression of the five Ba-PGRPs was measured in gill tissue by qPCR in different conditions which correspond to different symbiotic state (Table 3). First the relative expression of each isoforms in natural population was investigated (Fig 3). It appears that Ba-PGRP 3 and 5 have a significant higher expression in gills than Ba-PGRP 1 and 4 whereas Ba-PGRP2 is not significantly different from these 4 isoforms. It seems from this first analysis that Ba-PGRP 3 and 5 are the two isoforms expressed in gills. Gills are directly exposed to the environment due to the water flux they entertain and because of the main function of PGRPs it seems that these two isoforms may be implicated in response to environmental changes or in regulation of symbiosis. To go further we investigated the relative expression of the 5 isoforms in individuals that have lost part or most of their

symbiont and compared it to the relative expression in natural population individuals (Fig 4). Interestingly Ba-PGRP 1, 2 and 3 have the same expression pattern. Indeed, the translocation of mussels away from the venting area (on basalt) and the loss of symbionts induced a down-regulation of these 3 isoforms that is significantly different from natural population in BT2 and BT3 (only for Ba-PGRP 1 and 3). The expression pattern is not very different in Ba-PGRP 4 with a significant down-regulation of this isoform in BT1, BT2 and BT3, even if we observed a slight up-regulation in BT3 compared to BT2. The same tendency is observed in Ba-PGRP 5 but it is not significant. Then, we analysed the relative expression of the five isoforms in mussels that were translocated away from venting area during 6 days, and then re-exposed to hydrothermal fluid in their original mussel bed (Fig 5). Results show no significant difference between BT1 and translocated in 4 isoforms (Ba-PGRP 1, 3, 4, 5) whereas Ba-PGRP2 is significantly up-regulated in TR1.3 compared to TR1.2. Results from mussels that were brought back to their mussel bed show a high inter-individual variability in their expression and no general trend can be observed.

## Discussion

In this study we first identified five isoforms of PGRPs from the gills of the deep sea hydrothermal vent mussel *B. azoricus*. Four of them, the short ones, are predicted to possess an amidase activity (isoforms 2, 3, 4 and 5). Amidase activity is available to kill bacteria, by hydrolysing the PGN of bacterial cell wall. This killing activity leads some PGRPs to act as antimicrobial peptides by terminating the immune response (Mellroth and Steiner, 2006). Among those four short PGRPs, two of them (Ba-PGRPs 3 and 5) are predicted to possess a signal peptide. Interestingly those two isoforms have the highest expression in gills of individuals from natural population. We can therefore hypothesis that in natural population those two PGRPs are secreted into the extracellular space where they may recognize and/or hydrolyse bacteria. Moreover, PGRPs 2 and 5, are clearly directed against DAP-type PGN whereas Ba PGRPs 1, 3 and 4, could modulate their affinity for the DAP-type. PGRPs have been identified in several other bivalves (*C. gigas*, *M. galloprovincialis*, *H. cumingii* etc) and in different tissues (Itoh & Takahashi 2008; Bettencourt et al. 2010). Bettencourt and co-authors observed that one PGRP was found to be highly expressed in gills of *B. azoricus* but expression of this protein didn't respond to a bacterial challenge (Bettencourt et al., 2010, 2014; Martins et al., 2014). PGRPs putative implication in symbiotic associations has already been investigated in other invertebrates (*E. scolopes/V. fischeri*, tse-tse fly/*Wigglesworthia* etc) (Troll et al., 2009, 2010; Wang and Aksoy, 2012). Indeed in the mutualistic association between the weevil *Sitophilus zeamais* and its symbiont, Anselme and collaborators observed an accumulation of wPGRP transcript in the adult bacteriome in presence of symbiotic bacteria (Anselme et al., 2006). In the symbiotic association between the hydrothermal vent tubeworm *Ridgea piscesae* and thiotrophic bacteria, five PGRPs were expressed significantly higher in the symbiotic organ (trophosome) compared to the plume (non-symbiotic organ) (Nyholm et al., 2012). In those studies authors hypothesised that this protein could be involved in the regulation of symbiotic bacterial population rather than detection or elimination of pathogenic bacteria.

To further the implication of PGRPs in the *B. azoricus* symbiosis we analysed the expression of the five PGRP isoforms depending on the symbiotic state of mussels. We observed that the expression of four PGRPs (1, 2, 3 and 4) decreased with the loss of symbionts when Ba-PGRP 5 is less affected. We also observed that maintenance of symbiotic rate (TR1.3) induces the expression of Ba-PGRP 2. Overall, the repression of four PGRPs' expression during endosymbiont release and the induction of Ba-PGRP2 during maintenance attest of a

putative role of these proteins in the symbiotic association. Moreover gill colonisation by endosymbiotic bacteria is a continuous process throughout the mussel lifetime (Wentrup et al., 2014) suggesting a continuous expression of genes that are necessary to acquire and regulate symbionts. In this study we hypothesize (i) that Ba-PGRP 1, 2 and 4 could be implicated in the regulation of symbiont density, growth and/or invasion within the gill bacteriocytes because of their lower expression in gills, and down-regulation when symbionts are lost. At the same time, Ba-PGRP 3 and 5 seems to be different because of then presence of a signal peptide in their sequence and their high expression in symbiont-loaded bacteriocytes. We are therefore hypothesizing (ii) that secreted PGRPs are implicated in the initial step of symbiont acquisition and would rather be used as a signal of cooperation to indicate the correct location for bacterial colonisation (Reynolds and Rolff, 2008). On bare basalt, where less free-living bacteria are observed, this cooperation signal would be down-regulated. Future investigations need to focus on the expression of those isoforms in other tissues and on their potential link with Imd or Toll pathway. So far, no data have reported the direct implication of PGRPs in the association between the deep sea hydrothermal vent mussel *B. azoricus* and SOX/MOX bacteria.

## References

- Anselme, C., Vallier, A., Balmand, S., Fauvarque, M.-O., and Heddi, A. (2006). Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6766–6772.
- Barros, I., Divya, B., Martins, I., Vandeperre, F., Santos, R.S., and Bettencourt, R. (2015). Post-capture immune gene expression studies in the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* acclimatized to atmospheric pressure. *Fish Shellfish Immunol.* 42, 159–170.
- Bettencourt, R., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, P., Afonso, M., Shank, T., and Santos, R.S. (2010). High-throughput sequencing and analysis of the gill tissue transcriptome from the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *BMC Genomics* 11, 559.
- Bettencourt, R., Rodrigues, M., Barros, I., Cerqueira, T., Freitas, C., Costa, V., Pinheiro, M., Egas, C., and Santos, R.S. (2014). Site-related differences in gene expression and bacterial densities in the mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Menez Gwen and Lucky Strike deep-sea hydrothermal vent sites. *Fish Shellfish Immunol.* 39, 343–353.
- Boutet, I., Ripp, R., Lecompte, O., Dossat, C., Corre, E., Tanguy, A., and Lallier, F.H. (2011). Conjugating effects of symbionts and environmental factors on gene expression in deep-sea hydrothermal vent mussels. *BMC Genomics* 12, 530.
- Cavanaugh, C.M., Wirsén, C.O., and Jannasch, H.W. (1992). Evidence for Methylophilic Symbionts in a Hydrothermal Vent Mussel (*Bivalvia*: *Mytilidae*) from the Mid-Atlantic Ridge. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3799–3803.
- Choe, A.K., Werner, T., Stöven, S., Hultmark, D., and Kathryn, V. (2002). requirement for a Peptidoglycan recognition Protein (PGRP) in Relish Activation and Antibacterial Immune Responses in *Drosophila*. *Science* (80-. ). 296, 359–362.
- Colaço, a., Dehairs, F., and Desbruyères, D. (2002). Nutritional relations of deep-sea hydrothermal fields at the Mid-Atlantic Ridge: a stable isotope approach. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 49, 395–412.
- Distel, D.L., Lee, H.K., and Cavanaugh, C.M. (1995). Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 92, 9598–9602.
- Van dover, C.L., and Fry, B. (1994). Microorganisms as food resources at deep-sea hydrothermal vents. *Limnol Ocean.* 39, 51–57.
- Duperron, S., Bergin, C., Zielinski, F., Blazejak, a, Pernthaler, a, McKiness, Z.P., DeChaine, E., Cavanaugh, C.M., and Dubilier, N. (2006). A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (*Bivalvia* : *Mytilidae*), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environ. Microbiol.* 8, 1441–1447.
- Dziarski, R., Dziarski, R., Gupta, D., and Gupta, D. (2006). The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.* 7, 232.
- Fiala-Médioni, A., McKiness, Z.P., Dando, P., Boulegue, J., Mariotti, A., Alayse-Danet, A.M., Robinson, J., and Cavanaugh, C. (2002). Ultrastructural, biochemical, and immunological characterization of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid-Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Mar. Biol.* 141, 1035–1043.
- Gelius, E., Persson, C., Karlsson, J., and Steiner, H. (2003). A mammalian peptidoglycan recognition protein with N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 988–994.
- Gerdol, M., and Venier, P. (2015). An updated molecular basis for mussel immunity. *Fish Shellfish Immunol.*

- Guan, R., and Mariuzza, R. a. (2007). Peptidoglycan recognition proteins of the innate immune system. *Trends Microbiol.* *15*, 127–134.
- Halary, S., Riou, V., Gaill, F., Boudier, T., and Duperron, S. (2008). 3D FISH for the quantification of methane- and sulphur-oxidizing endosymbionts in bacteriocytes of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *ISME J.* *2*, 284–292.
- Itoh, N., and Takahashi, K.G. (2008). Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* *150*, 409–417.
- Kádár, E., Bettencourt, R., Costa, V., Santos, R.S., Lobo-da-Cunha, A., and Dando, P. (2005). Experimentally induced endosymbiont loss and re-acquirement in the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* *318*, 99–110.
- Kaneko, T., Yano, T., Aggarwal, K., Lim, J.-H., Ueda, K., Oshima, Y., Peach, C., Erturk-Hasdemir, D., Goldman, W.E., Oh, B.-H., et al. (2006). PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat. Immunol.* *7*, 715–723.
- Kim, M.-S., Byun, M., and Oh, B.-H. (2003). Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat. Immunol.* *4*, 787–793.
- Kyuno, A., Shintaku, M., Fujita, Y., Matsumoto, H., Utsumi, M., Watanabe, H., Fujiwara, Y., and Miyazaki, J.-I. (2009). Dispersal and Differentiation of Deep-Sea Mussels of the Genus *Bathymodiolus* (Mytilidae, Bathymodiolinae). *J. Mar. Biol.* *2009*, 1–15.
- Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J.-H., Caroff, M., Lee, W.-J., Mengin-Lecreulx, D., and Lemaitre, B. (2003). The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat. Immunol.* *4*, 478–484.
- Li, X., Wang, S., Qi, J., Echtenkamp, S.F., Chatterjee, R., Wang, M., Boons, G.J., Dziarski, R., and Gupta, D. (2007). Zebrafish Peptidoglycan Recognition Proteins Are Bactericidal Amidases Essential for Defense against Bacterial Infections. *Immunity* *27*, 518–529.
- Lim, J.-H., Kim, M.-S., Kim, H.-E., Yano, T., Oshima, Y., Aggarwal, K., Goldman, W.E., Silverman, N., Kurata, S., and Oh, B.-H. (2006). Structural basis for preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins. *J. Biol. Chem.* *281*, 8286–8295.
- Martins, E., Figueras, A., Novoa, B., Santos, R.S., Moreira, R., and Bettencourt, R. (2014). Comparative study of immune responses in the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* and the shallow-water mussel *Mytilus galloprovincialis* challenged with *Vibrio* bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* *40*, 485–499.
- Mellroth, P., and Steiner, H. (2006). PGRP-SB1: An N-acetylmuramoyl l-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *350*, 994–999.
- Michel, T., Reichhart, J.M., Hoffmann, J. a, and Royet, J. (2001). *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* *414*, 756–759.
- Miyazaki, J.-I., de Oliveira Martins, L., Fujita, Y., Matsumoto, H., and Fujiwara, Y. (2010). Evolutionary process of deep-sea bathymodiolus mussels. *PLoS One* *5*, e10363.
- Nyholm, S. V., Song, P., Dang, J., Bunce, C., and Girguis, P.R. (2012). Expression and putative function of innate immunity genes under in situ conditions in the symbiotic hydrothermal vent tubeworm *Ridgeia piscesae*. *PLoS One* *7*, 1–12.
- Le Pennec, M Donval, A Herry, A. (1990). Nutritional strategies of the hydrothermal ecosystem bivalves. *Prog. Ocean.* *24*, 71–80.



- Reynolds, S., and Rolff, J. (2008). Immune function keeps endosymbionts under control. *J. Biol.* 7, 28.
- Salerno, J.L., Macko, S.A., Hallam, S.J., Bright, M., Won, Y., Kiness, Z.O.E.M.C., and Dover, C.L.V.A.N. (2005). Characterization of Symbiont Populations in Life-History Stages of Mussels From Chemosynthetic Environments. 145–155.
- Swaminathan, C., Brown, P., Roychowdhury, a, Wang, Q., Guan, R., Silverman, N., Goldman, W., Boons, G.-J., and Mariuzza, R. (2006). Dual strategies for peptidoglycan discrimination by peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 684–649.
- Takehana, A., Yano, T., Mita, S., Kotani, A., Oshima, Y., and Kurata, S. (2004). Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *EMBO J.* 23, 4690–4700.
- Tanguy, A., Bierre, N., Saavedra, C., Pina, B., Bachère, E., Kube, M., Bazin, E., Bonhomme, F., Boudry, P., Boulo, V., et al. (2008). Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene* 408, 27–36.
- Toubiana, M., Rosani, U., Giambelluca, S., Cammarata, M., Gerdol, M., Pallavicini, A., Venier, P., and Roch, P. (2014). Toll signal transduction pathway in bivalves: Complete cds of intermediate elements and related gene transcription levels in hemocytes of immune stimulated *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* 45, 300–312.
- Troll, J. V., Adin, D.M., Wier, A.M., Paquette, N., Silverman, N., Goldman, W.E., Stadermann, F.J., Stabb, E. V, and McFall-Ngai, M.J. (2009). Peptidoglycan induces loss of a nuclear peptidoglycan recognition protein during host tissue development in a beneficial animal-bacterial symbiosis. *Cell. Microbiol.* 11, 1114–1127.
- Troll, J. V., Bent, E.H., Pacquette, N., Wier, A.M., Goldman, W.E., Silverman, N., and McFall-Ngai, M.J. (2010). Taming the symbiont for coexistence: a host PGRP neutralizes a bacterial symbiont toxin. *Environ. Microbiol.* 12, 2190–2203.
- Wang, J., and Aksoy, S. (2012). PGRP-LB is a maternally transmitted immune milk protein that influences symbiosis and parasitism in tsetse ' s offspring. *Pnas* 109, 10552–10557.
- Wang, Z.M., Li, X., Cocklin, R.R., Wang, M., Wang, M., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Gupta, D., and Dziarski, R. (2003). Human peptidoglycan recognition protein-L is an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J. Biol. Chem.* 278, 49044–49052.
- Wentrup, C., Wendeberg, A., Schimak, M., Borowski, C., and Dubilier, N. (2014). Forever competent: deep-sea bivalves are colonized by their chemosynthetic symbionts throughout their lifetime. *Environ. Microbiol.* 16, 3699–3713.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13772–13777.
- Won, Y.-J., Hallam, S.J., O'Mullan, G.D., Pan, I.L., Buck, K.R., and Vrijenhoek, R.C. (2003). Environmental Acquisition of Thiotrophic Endosymbionts by Deep-Sea Mussels of the Genus *Bathymodiolus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6785–6792.
- Yoshida, H., Kinoshita, K., and Ashida, M. (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 271, 13854–13860.

### **Acknowledgements**

We thank the crew and pilots of the NO Pourquoi Pas? and the ROV Victor 6000 for their assistance and technical support, as well as the chief scientist Blandin Jerome during the MomarSAT 2013 cruise. Camille Détrée is supported by a PhD grant from Région Bretagne (ARED APROSBAZ) and UPMC.

**Table**

Table 1: Sequence of primers used for real-time PCR amplification

Genes	Primer sequences 5'-3'
RPL15	For 5'-TATGGTAAACCTAAGACACAAGGATG-3' Rev 5'-TGGAATGGATCAATCAAAATGATTTC-3'
Ba-PGRP 1	For 5'-GTCTTCATACATCATACTGCCATGAGTTA-3' Rev 5'-CCATTATAGAAACGCTACTGCAACGTC-3'
Ba-PGRP 2	For 5'-GCTGTGATGATGCATGTAGCAGCCCCATC-3' Rev 5'-CTTGTATGGCACTCTGCATCAGTACAACC-3'
Ba-PGRP 3	For 5'-ATGATATGGGCTATTCTTCCGCTCGTTGC-3' Rev 5'-TAATTGTAACACCGGAACAATCACCGGT-3'
Ba-PGRP 4	For 5'-GCCTTAAGTGTGACATCCACCCGACG-3' Rev 5'-AAGCATGCCGGTAGCCACTCTACA-3'
Ba-PGRP 5	For 5'-ACAGGGTCTCACACACCACAGCTGGGTGTCC-3' Rev 5'-GTACATCCACCCGACGCCCCATGATGGAT-3'

Table 2: Molecular properties of the five PGRPs isoforms of *Bathymodiolus azoricus*.

Name	Length	Signal peptide	MW (Da)*	Theoretical pI*	Cys residues
Ba-PGRP1	431	No	49367	6.55	15
Ba-PGRP2	195	No	22274.9	6.35	5
Ba-PGRP3	235	1-17	25983.1/24158.7	9.89/9.89	11/11
Ba-PGRP4	223	No	24795.4	6.66	11
Ba-PGRP5	265	1-17	28555.9/26764.7	7.7/8.05	10/10

\*Molecular weight and pI were determined with or without the signal peptide

Table 3: Relative quantification of SOX symbionts in the different *in situ* experimental conditions (from Detree et al 2015).

	Experimental conditions	SOX relative quantification (U)
Natural population	/	805
BT1	6 days on basalt	374
BT2	20 days on basalt	79
BT3	27 days on basalt	73
TR1.2	6 days on basalt, brought back to mussel bed for 14 days	358
TR1.3	6 days on basalt, brought back to mussel bed for 21 days	407

## Figures

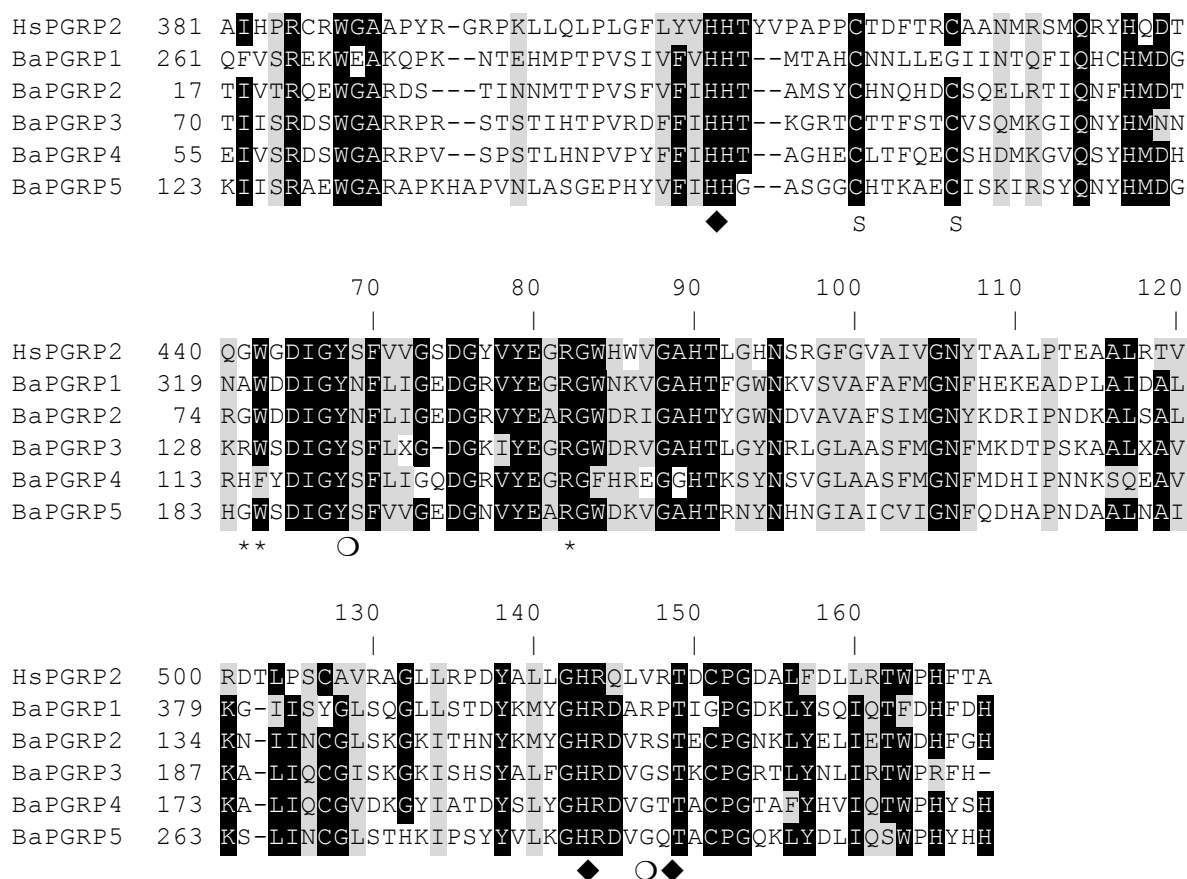


Figure 1 : Multiple alignment of the Ba-PGRPs domain.

The black and grey regions indicate positions where amino acid residues are conserved or highly similar, respectively. \*: residues implicated in the DAP-type PGN selectivity. ◆. Zn<sup>2+</sup> binding site, ○ residues contributing to amidase activity. s: cysteine residues implicated in the disulphide bridge. HsPGRP2 : Human PGRP2 (access number Uniprot Q96PD5).

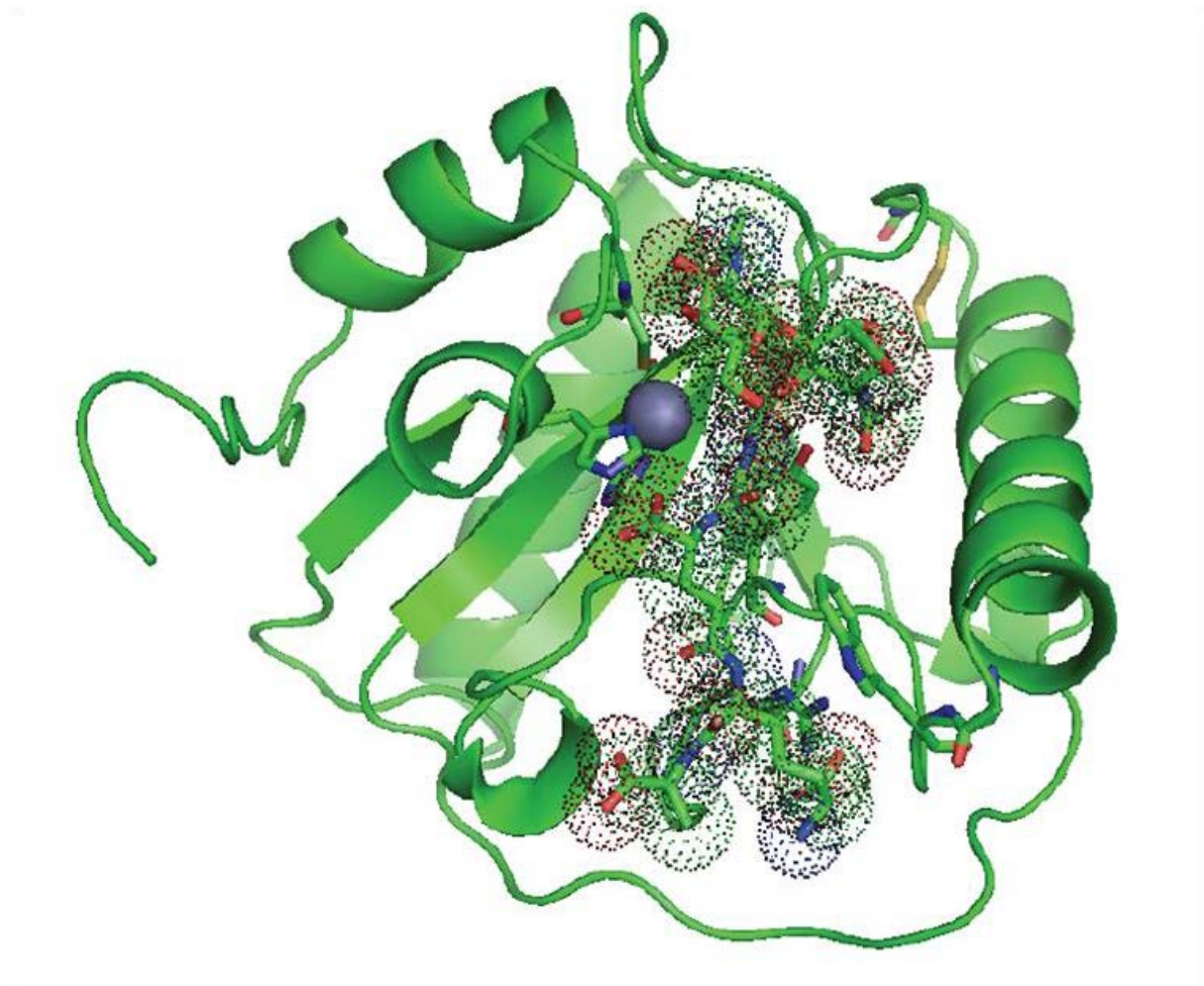


Figure 2: Ribbon representation of the 3D model of Ba-PGRP 2. This model was obtained by homology modeling (Modeller 9v8, Template PGRP-LE from *Drosophila melanogaster*, cristallized with the tracheal cytotoxin as substrate pdb: 2CB3). Dots : tracheal cytotoxin

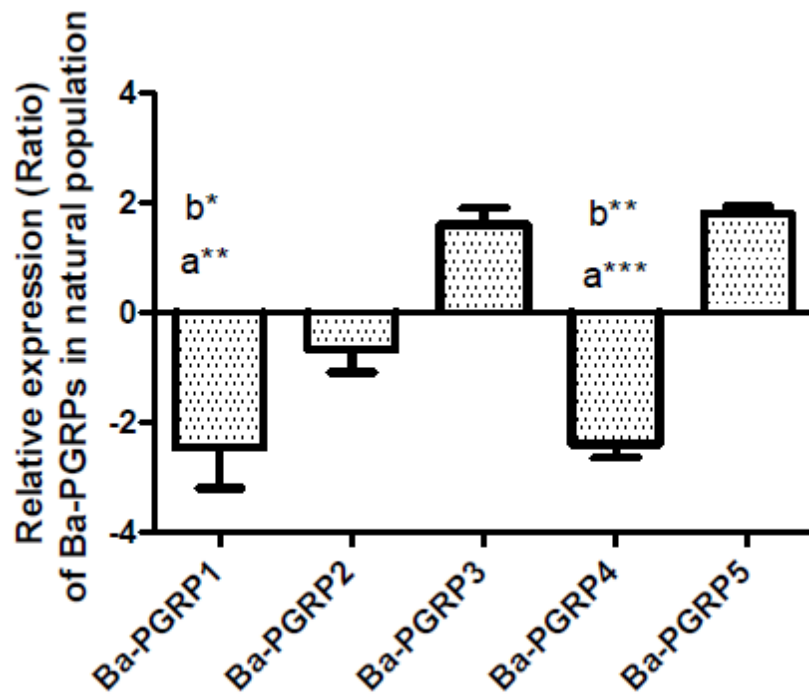


Figure 3: Relative expression (Ratio) of the 5 Ba-PGRPs isoforms in *B. azoricus* gills in natural population. a: significantly different from Ba-PGRP3 and b: significantly different from Ba-PGRP5. (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$ , \*\*\*:  $p < 0.0001$ ). (Kruskal-Wallis test, Dunns post test).

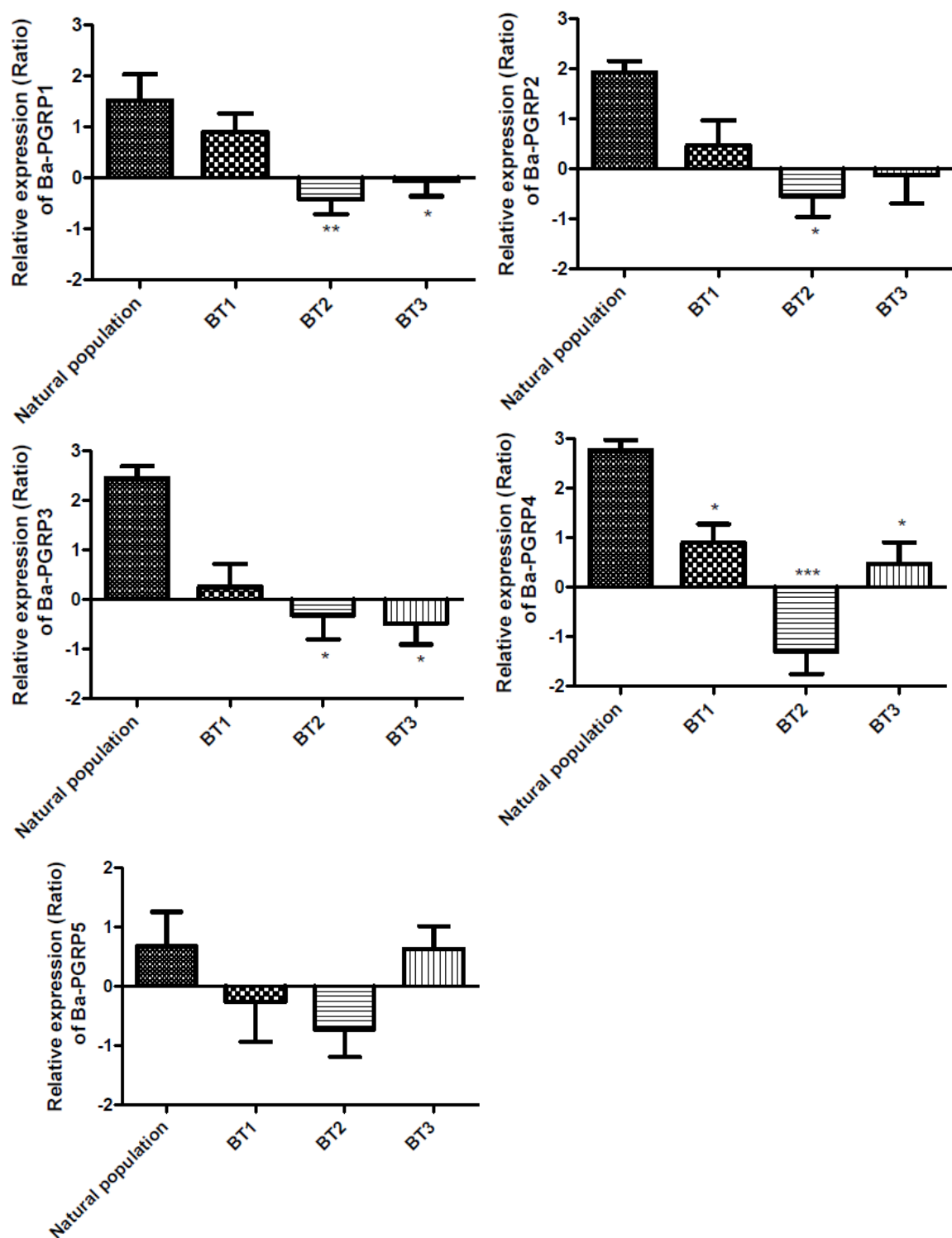


Figure 4: Relative expression of PGRPs isoforms in *B.azoricus* gills in natural population and after symbiont loss. Relative expression level of mRNA (Ratio) is indicated in: Natural population (n=10), Basalt T1 (n=15), T2 (n=19) and T3 (n=22). \*significantly different from



Natural population. (\*:  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ). (Kruskal-Wallis test, Dunns post test).

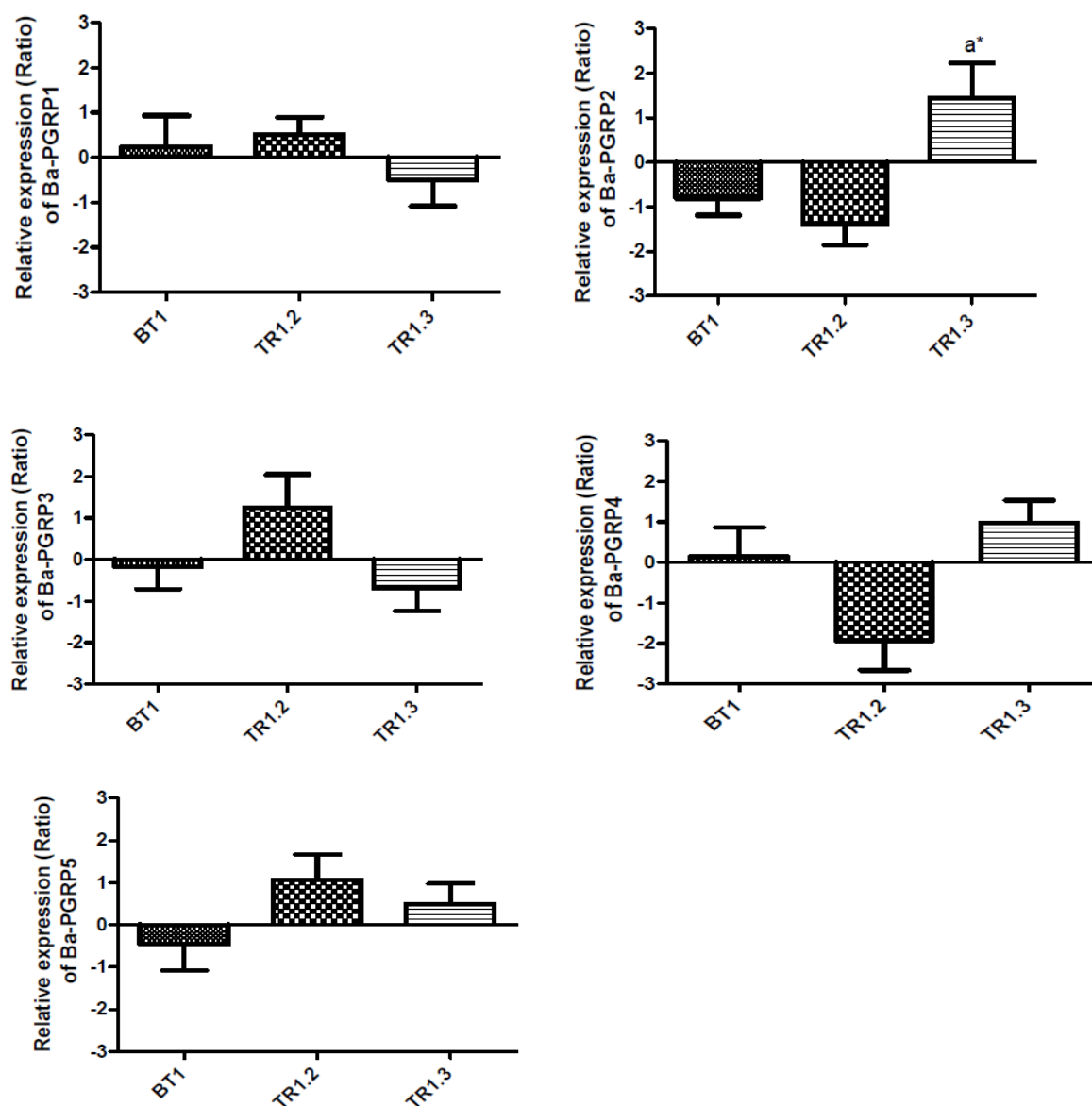


Figure 5: Relative expression of PGRPs isoforms in *B. azoricus* gills in BT1 (n=15) and after translocation (TR1.2, n=10; TR1.3, n=11). Relative expression level of mRNA are indicated for each condition: Basalt T1 (n=15), TR1.2 (n=10) and TR1.3 (n=11). a: Significantly different from TR1.2. (\*:  $p < 0.05$ ). (Kruskal-Wallis test, Dunns post test).



### III. Rôle des processus apoptotiques dans la régulation de la charge symbiotique

#### Article en préparation

Le troisième volet de ce chapitre IV correspond à l'étude de l'expression de gènes pro- et anti-apoptotiques dans les cellules branchiales de *B. azoricus* dans la population naturelle et après perte ou maintien des symbiotes. L'approche globale présentée dans le chapitre III a mené à l'identification de nombreux acteurs de l'apoptose, avec notamment une surexpression d'acteurs pro-apoptotiques en BT2 et BT3. Cependant les résultats obtenus, en particulier sur la population naturelle ou en BT1, montrent un équilibre entre mécanismes pro- et anti-apoptotiques, rendant l'analyse des expérimentations *in situ* plus complexe et impliquant la nécessité d'analyser ces processus de façon plus précise.

L'apoptose ou Programmed Cell Death I (PCD\_I) est un processus important important dans l'homéostasie cellulaire ou la régulation du développement mais qui est aussi considéré comme un mécanisme de défense de l'organisme. Chez les mollusques l'apoptose joue un rôle fondamental dans la défense contre des pathogènes ou dans la réponse aux polluants ou toxines environnementaux (Kiss, 2010). Le processus apoptotique est initié *via* la voie intrinsèque (mitochondriale) ou extrinsèque (associée à des récepteurs membranaires). Dans le cas de la voie extrinsèque, l'activation des « death receptors » de type TNFR (Tumor Necrosis Factor receptor) par un ligand extérieur (FAS, Apoptosis Stimulating Fragment) induit la translocation et le recrutement de ligand FADD (Fas Associated protein with Death Domain) menant à l'activation et au recrutement de caspases, effecteurs de PCD I. La voie intrinsèque est plutôt activée lors de stress environnementaux (UV, polluants, métaux lourds, etc). Cette voie est sous le contrôle de protéines de la famille Bcl-2 qui peuvent être pro-apoptotique (Bax, Bad, Bak) ou anti-apoptotique (Bcl-2, Bax inhibitor). Au-delà de son rôle dans l'immunité, l'apoptose semble être souvent impliquée dans des associations symbiotiques lors de l'acquisition de symbiotes (morphogenèse de tissus ou organes symbiotique) (Foster et al., 2000) mais aussi dans la régulation de la densité symbiotique (chez *B. thermophilus* notamment) (Guezi et al in prep).

Pour analyser l'implication de ces processus apoptotiques dans la symbiose chez *B. azoricus* nous avons analysé l'expression par PCR quantitative de 18 gènes pro-ou anti-apoptotiques au sein de la population naturelle ainsi que dans les expérimentations *in situ* de perte et de

maintien des symbiotes. Parallèlement nous avons étudié l'expression de gènes impliqués dans la défense de l'organisme contre les radicaux libres (SOD, superoxyde dismutase) ou contre des microorganismes parasites (NOS, oxyde nitrique synthase) (Forstermann and Sessa, 2012). Les résultats de PCR quantitative montrent une limitation ou une inhibition de l'apoptose dans les conditions BT1 et BT2. Cette limitation pourrait être un moyen pour l'hôte de favoriser la prolifération des symbiotes et contrecarrer une diminution plus ou moins importante de la densité symbiotique. A l'inverse, la translocation du basalte vers la moulière (TR1.3) induit une surexpression des transcrits impliqués dans des processus apoptotiques. Dans ce cas, nous faisons l'hypothèse que le retour sur la moulière et l'accès retrouvé aux composés réduits induirait une prolifération des symbiotes qui serait régulée *via* l'apoptose. Enfin, nous avons observé une induction de l'apoptose en BT3 suggérant un remaniement de l'épithélium branchial ou une entrée en apoptose de cellules contenant des symbiotes mourants. Enfin, la surexpression de NOS lorsque l'apoptose est activée suggère une forte production de monoxyde d'azote qui pourrait agir comme un activateur apoptotique en réponse à une prolifération symbiotique.

## **Involvement of apoptosis in the regulation of the bacterial symbionts of the hydrothermal mussel *Bathymodiolus azoricus*.**

Détrée, C.<sup>1</sup>, Hervé, A.<sup>1</sup>, Mary, J.<sup>1</sup>, Lallier, F.H.<sup>1</sup> and Tanguy, A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, CNRS UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Equipe ABICE, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

**Key words:** hydrothermal vent, mussel, *Bathymodiolus azoricus*, apoptosis, transcriptome, symbiosis.

## Abstract

Apoptosis is an essential biological process in the development of many organisms. It is also a mechanism of host defence against environmental stress factors or pathogens by contributing to the elimination of infected cells. The aim of this study was to measure the relative expression of pro - and anti-apoptotic genes in the gills of *Bathymodiolus azoricus*. This bivalve species lives close to deep-sea hydrothermal vents of the Mid-Atlantic Ridge (MAR) and it harbours in specialized gill cells two types of endosymbionts: sulphide oxidizing bacteria (SOX) and methanotrophic bacteria (MOX). Symbiotic associations are thought to be ruled by specific mechanisms or actors of regulation to deal with the presence of symbionts but these mechanisms are still poorly understood in this symbiosis. Here, we test the hypothesis that apoptosis may contribute to host regulation of symbionts content. To sustain this hypothesis we conducted quantitative PCR on 18 apoptotic genes expressed in the gills of individuals (i) from a natural population at Lucky Strike, Montsegur site (MAR), and (ii) from *in situ* experiments designed to alter symbiont contents in mussel gills. Globally, results show an inhibition of apoptosis when symbionts content is low and an induction of apoptotic mechanisms when symbiotic content is increasing suggesting an implication of apoptosis in symbiont content regulation.

## 1. Introduction

Apoptosis, or programmed cell death type I, is characterized as a well-organized cellular process in which all cellular components are sequestered and operate in a specific order without the induction of inflammation. Apoptosis plays a fundamental role in organism protection against numerous sources of disorders including pathogens or environmental stressors, but also in development and cellular homeostasis (Opferman and Korsmeyer, 2003; Vaux and Korsmeyer, 1999).

Apoptosis can be separated in two major pathways the intrinsic (or mitochondrial) pathway which is mainly activated in response to internal cellular damages and environmental stressors, and the extrinsic, or death receptor-activated, pathway which responds to death signals. The extrinsic pathway is mainly mediated by the super family of Tumor Necrosis Factor receptors (TNF-R) and other death receptors such as Fas/CD95, TRAIL or some G-protein coupled receptors (GPCR) (Kiss, 2010). The intrinsic pathway is under the control of pro and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family (such as Bax, Bcl-2, Bad). Both pathways act independently even if there is substantial cross-talk allowed to amplify the death signal (Feig and Peter, 2007). These pathways are under the control of a specific family of cysteine proteases (caspases) that cleaves target proteins at specific sites. Among all caspases involved in apoptosis, a distinction is made between initiator caspases (e.g., caspases 2, 8, 9 and 10) and effector caspases (e.g., caspase 3, 6 and 7). Initiator caspases cleave and activate the effector caspases leading to cell death (Romero et al., 2011).

Significant progress has been made in the understanding of the involvement of apoptosis in the molluscan immune system in response to parasites and pathogens (Goedken et al., 2005; Sunila and LaBanca, 2003), or in response to environmental stressors such as UV (Estévez-Calvar et al., 2013). However, involvement of apoptosis in the case of mutualistic associations between molluscs and symbiotic bacteria, even if highly suspected to play a role in the

regulation of bacterial populations, remains to be better documented. In the shallow-water lucinid *Codakia orbiculata* which presents a symbiosis with sulfuroxidizing bacteria, Elisabeth et al. (2012) showed that gill tissue structure was altered in response to the loss or gain of symbionts (Elisabeth et al., 2012). They suggested that this alteration was a way to compensate for changes in nutrient level, and hypothesized that apoptosis strongly participated to gill tissue reorganization and symbionts eradication. Many hydrothermal species developed different specialization including symbiosis as a response to harsh environmental factors and absence of primary production limiting their ability to feed on phytoplankton. The mussel *Bathymodiolus azoricus* that represents an emblematic species of the Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vents harbors a double endosymbiosis with sulfur-oxidizing bacteria (SOX) and methanotrophic bacteria (MOX), both located in the gills (Duperron et al., 2006; Fiala-Médioni et al., 2002). Previous studies conducted on symbiosis in *B. azoricus* demonstrated the plasticity of this relation (Boutet et al., 2011; Guezi et al., 2014) but molecular mechanisms governing symbionts regulation remain poorly understood. In this study, we aimed to evaluate the role of apoptosis on the symbiont content regulation using gene expression of a large set of genes involved in the different apoptotic pathways described in mollusc species and also genes involved in ROS (Reactive Oxygen Species) and NOS (Nitric Oxide Synthase) detoxification.



## **2. Materials and methods**

### **2.1. Samples collection and experimental design**

Deep sea mussels *Bathymodiolus azoricus* were collected from one hydrothermal vent site (Lucky Strike, population of Montsegur, 37°17,286' N, 32°16,530' W; 1700 m depth) located on the Mid Atlantic Ridge during the BioBaz and MoMARSAT cruises (July/August 2013). The sampling was done using the Remote Operating Vehicle (ROV) Victor 6000 operated from the Research Vessel “Pourquoi pas?”. Around 30 mussels representing the natural population were collected and placed in hermetic boxes then brought on board within 2 hours. Gills, mantle and digestive gland were immediately dissected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until further analysis.

For *in situ* experiments, between 15 and 30 mussels were put in several wire cages and 5 of them were placed a dozen meters away from the hydrothermal venting area. This condition was called “basalt”, B. Cages were brought back on board after 6 days (BT1), 20 days (BT2) and 27 days (BT3) on basalt. In addition, after 6 days on basalt (BT1), 2 cages were translocated back from basalt to their original mussel bed in the venting area, and brought back to the research vessel after respectively 14 days (TR1.2) and 21 days (TR1.3) on mussel bed. Immediately after collection, gills were dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

### **2.2. Gene selection and mRNA quantification:**

The mRNA expression of 18 genes involved in pro and anti-apoptotic pathways was analysed by real-time PCR in all samples. Gene sequences have been collected from available *B. azoricus* EST libraries (Tanguy et al., 2008). Total RNA was extracted from mussel gills by using Tri-Reagent (Sigma) according to the manufacturer's instructions. Two µg of total RNA were reverse transcribed using M-MLV reverse transcriptase (Promega), an anchor-oligo(dT) primer (5'-CGCTCTAGAACTAGTGGATCT<sub>(17)</sub>-3') and random hexamers (Promega). A

volume of 2.1 µl of each diluted reverse transcription product (1:200) was subjected to real-time PCR in a final volume of 5 µl containing 70 nM of each specific primer and 2×Lightcycler®480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Mannheim Germany) using a Light Cycler 480 machine (Roche Diagnostics, Mannheim Germany). The amplification was carried out in duplicate as follows: initial enzyme activation at 94°C for 15 min followed by 45 cycles of 94°C for 15 sec, 60°C for 30 sec and 72°C for 30sec. A dissociation curve was generated and PCR efficiency was estimated for each primer pair. All primer pairs tested generated a single peak in the dissociation curve and a PCR efficiency of 95 to 100%. Relative expression of each gene (fold-change to control) was calculated according to comparative Ct method using the formula:  $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$  (with  $\Delta C_{t_{\text{geneX}}} = C_{t_{\text{GeneX}}} - C_{t_{\text{RiboL15}}}$ ;  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{geneX}}} - \text{mean} C_{t_{\text{geneX}}}$ ). A fragment of ribosomal protein L15 gene (RpL15) from the host was used as the internal PCR control. Gene name, primer sequences and apoptotic pathways are provided in Table 1.

### 2.3. Relative quantification of symbionts

DNA extraction was performed on gill tissues and determination of the relative quantity of both methanotrophic and sulphide-oxidizing bacteria was estimated by real-time PCR according to the protocol available in Boutet *et al.* (2011). Symbiont content is expressed in relative unit (U) which corresponds to the relative abundance of symbiont DNA compared to mussel DNA. Differences in symbionts content between conditions were tested using Kruskal-Wallis test.

### 2.4. Data analysis

In order to identify genes whose expression changed significantly according to the different conditions, we calculated the gene expression ratios according to the formula  $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$

$(\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gene}} \text{ X individual } i - Ct_{\text{RpL15}}) / \text{mean } Ct_{\text{gene}} \text{ X all individuals})$ . Then, levels of gene expression were standardized to a mean of zero and a variance of one (z-score transformation) with the R-language 'decostand' function of the 'vegan' package 'Vegan' package (Vegan: Community Ecology Package v. 1.8.3; <http://cran.r-project.org/>). We applied a T-test with permutations (n=100 permutations) using T-Mev software (<http://www.tm4.org/mev.html>).

### **3. Results**

#### **Basalt conditions, loss of symbionts**

Significantly up- or down-regulated genes identified in the comparison between the different kinetics points within the basalt conditions (T-test with 100 permutations) are presented in Table 2. In comparison with samples from natural population, BT1 mussels showed a significant decrease of expression for 5 genes linked to apoptosis (KappaB-Ras, Bcl-2, TNF- $\alpha$  ind, AIF1mito, 38 MAPK), 2 NOS genes and the MIF (Macrophage Inhibitory Factor). In the same comparison, we observed an increase of the expression of all SOD genes and one apoptotic gene (Bax inhibitor). For BT2, after 20 days on basalt, those genes showed a similar significant regulation and additional genes (IAP1, caspase 8, 9 and caspase 6) were also inhibited. For BT3, after 27 days on basalt, only 3 SOD, caspase 2 and Bax inhibitor are significantly up-regulated compared to natural population. Comparison between BT3 and BT2 also showed that 8 genes linked to apoptosis were up-regulated at 27 days but also 3 of the SODs and NOS1.

#### **Translocated conditions, stabilization of symbionts**

Significant up- or down-regulated genes identified in the comparison between the different kinetics points within the translocated conditions (T-test with 100 permutations) are presented in Table 3. In this analysis, translocated mussels were only compared to mussels that stayed 6 days on basalt (BT1). We observed that after 14 days back on the mussel bed (TR1.2), no gene except SOD 5 exhibited a significant change in expression. But after 21 days back on the mussel bed (TR1.3), eleven genes linked to apoptosis were significantly up-regulated compared to mussels from BT1. At the same time, five of the SODs and the two NOS genes were also up-regulated. Comparison between the two translocated samples showed a similar pattern of gene expression regulation.

#### 4. Discussion and conclusion

In this study, we investigated the potential role of apoptosis as a control mechanism of the symbiotic population in the hydrothermal mussel *B. azoricus*. In our experiment, for mussels kept away from venting area and experiencing a decrease of symbionts content (Detree et al 2015), we observed a differential expression of many of the pro - and anti-apoptotic actors of apoptosis. Regulation of apoptosis depends on a balance between these pro and anti-apoptotic factors. First, we observed at the three exposure times a significant up-regulation of Bax inhibitor (BI) gene which is known to be a major apoptosis suppressor, highly conserved between plants and mammals (Hückelhoven, 2004). BI inhibits Bax, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family that interferes with mitochondrial function by forming pores in the outer mitochondrial membrane (Danial and Korsmeyer, 2004). Bcl-2 family proteins comprise two types of proteins, anti- and pro-apoptotic proteins. During apoptosis, pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family translocate to the outer membrane of mitochondrion after posttranslational modification by caspases. Then Cytochrome c (Cyt c), apoptosis-inducing factors (AIFs), and different pro-apoptotic factors can be released from mitochondrion, triggering apoptosis. Bcl-2 family anti-apoptotic proteins sequestered in the mitochondrion have the ability to inhibit the release of Cyt.c and AIFs, and thus prevent apoptosis. Alignment of the Bcl2 gene identified in *B. azoricus* showed a strong homology with Bcl-2 found in *M. galloprovincialis* that seems to correspond to the anti-apoptotic type. The Bax/Bcl2 balance is known to modulate the caspase activation *via* the intrinsic pathway in some pathologies (Yang et al., 2002). Here, in BT1 and BT2 conditions the up-regulation of BI along with the down regulation of Bcl-2 and AIF1 mito seems to induce an inhibition of the intrinsic apoptotic pathway (Fig 1A-B). In BT3, we only observed the down-regulation of BI, suggesting a less important inhibition of this pathway. Moreover in BT1 and BT2, the down-regulation of TNF- $\alpha$  ind, suggest a potential inhibition of the extrinsic pathway. This inhibition of apoptosis

seems more important in BT2 where we also observed the down regulation of two initiator caspases (9 and 8) and one effector caspase (6) (Fig 1B). In BT3, BI is the only anti-apoptotic gene down-regulated and the up-regulation of the caspase 2 suggests an induction of apoptosis *via* the extrinsic pathway (Fig 1C).

In the translocated conditions no difference was found between BT1 and TR1.2 for the apoptotic genes, but in TR1.3 four anti-apoptotic genes were up-regulated. These genes are involved in the intrinsic apoptotic pathway again suggesting an inhibition of this pathway. But we also observed in TR1.3 a strong up-regulation of two effector caspases (8 and 9) and an initiator caspase (6). These results suggest an induction of apoptosis in TR1.3 *via* the extrinsic pathway (Fig 1D). Interestingly, we did not observe any significant regulation of the p53 gene and the p63/p73 genes in basalt or translocated conditions. The p53 protein is known to act directly or indirectly at different levels of apoptosis regulation through the induction of multiple apoptotic target genes but also by activating other transcription-independent mechanisms (Chipuk and Green, 2006). Regulation of p53 expression may contribute to the innate immunity in invertebrates and has also been studied in different mollusk species in the context of development such as *Spisula solidissima* (Jessen-Eller et al., 2002), *Mya arenaria* (Kelley et al., 2001), and *Crassostrea gigas* (Farcy et al., 2008). But, more importantly three p53 family proteins have been identified as involved in the establishment of the *Euprymna scolopes/V. fischeri* symbiosis. Indeed, authors hypothesis that the stress induced by the entry of *V. fischeri* in the symbiotic organ (light organ) activates p53 family members which contribute to the morphogenesis of the light organ by initiating apoptosis (Goodson et al., 2006).

In addition to apoptotic genes, we also investigated the relative expression of different superoxide dismutase and nitric oxide synthase genes. Indeed, nitric oxide (NO) which is an ubiquitous signaling molecule, has been evidenced to play a major role in the microbial

symbioses mediation in different species (Catalá et al., 2010; Wang and Ruby, 2011) and in the regulation of intrinsic (mitochondria-mediated) apoptosis (Brune et al., 1999; Tait and Green, 2010). In a study conducted on the symbiotic model *Aiptasia pulchella*-dinoflagellate, Hawkins et al (2013) evidenced that an increase of host NO production in response to thermal stress contributed to the collapse of the symbiosis through the activation of enzymes related to the initiation of apoptosis (Hawkins et al., 2013). In our experiment, we noticed that one or two NOS genes are down-regulated in both BT1 and BT2 compared to natural population whereas the two NOS are up-regulated in the translocated cages at TR1.3. These results showed that the NO production could increase when symbiont content is high in mussels and may be correlated with an activation of apoptosis.

The production of ROS is triggered by many cellular processes including depletion of cell antioxidant defence systems, destabilization of cell membranes and DNA damage (Lushchak, 2011). In species from deep-sea hydrothermal environments, antioxidant defences are often challenged with both exogenous ROS and potentially endogenous ROS as was shown for the Pompeii worm *Alvinella pompejana* (Jensen, 2001; Turrens, 2003). One of the main antioxidant enzymatic defence against the oxidative stress induced by ROS is the superoxide dismutase (SOD) family, which catalyses the superoxide anion  $O_2^-$  dismutation into hydrogen peroxide  $H_2O_2$  and dioxygen  $O_2$  in the presence of  $H^+$  (McCord et al., 1971). In our study, most isoforms of SOD show a clear pattern of up-regulation in both basalt and translocated conditions with a higher level of expression at TR1.3 than the one observed in natural population.

These results suggest that the lack of reduced substrates ( $H_2S$ ,  $H_2$ ,  $CH_4$ ) induces a loss of symbionts, which leads during the first 20 days to an inhibition of apoptosis mechanisms. Here we make the hypothesis that it is a way for the mussel to release its control of the proliferation of bacteria or at least to limit their degradation. Indeed, a decrease of symbionts

population also means a decrease in the nutritive status of the mussel. Allowing either the proliferation of symbionts within the bacteriocyte or the recruitment of new bacteria from the environment becomes a major issue. Under the hypothesis that apoptosis may limit bacteria proliferation (i), the down regulation of the apoptotic cascade would be in accordance with the facilitation of bacteria renewal. On the other hand, the up-regulation observed after 27 days of reduced substrates deprivation may reflect the concomittent further decrease in symbionts contents in the mussel. In this case triggering apoptosis might help mussels to get rid of dead symbionts.

For translocated samples, we observed an interesting response, which consists in maintenance of symbionts content in mussels showing that symbionts were able to proliferate again or that mussel acquired new ones. These results combined with an induction of apoptosis favors our hypothesis (i). Although we cannot exclude that regulation of apoptotic mechanisms might also be triggered by symbionts as it was observed in parasitic models (Carmen and Sinai, 2007; Pannebakker et al., 2007), our results suggest a regulation of apoptosis by the host to control symbionts proliferation.

Moreover NOS expression seems to be linked with symbiont content and apoptosis mechanisms. Indeed, the strong production of NO when symbionts content is high in mussels may induce apoptotic mechanisms as shown by Hawkins et al (2013) (Fig 1 D). The up-regulation of SOD genes in our experimental conditions does not seem to be linked with symbiotic content, but could be a consequence of the stress of experimentations that leads to a strong production of ROS by mussels. Further analysis including NO quantification and SOD activity determination are needed to better investigate the involvement of both process in this symbiotic relation.



## **Acknowledgments**

The research leading to these results has received funding from the grant agreement n° 226354" and the JST CNRS program "*Bathymodiolus*" and Camille Détrée is supported by a PhD grant from Région Bretagne (ARED APROSBZ) and UPMC. Moreover, we thank the crew and pilots of the NO Pourquoi Pas? and the ROV Victor 6000 for their assistance and technical support, as well as the chief scientist Blandin Jerome during the MomarSAT 2013 cruise.

## References

- Boutet, I., Ripp, R., Lecompte, O., Dossat, C., Corre, E., Tanguy, A., and Lallier, F.H. (2011). Conjugating effects of symbionts and environmental factors on gene expression in deep-sea hydrothermal vent mussels. *BMC Genomics* 12, 530.
- Brune, B., von Knethen, a, and Sandau, K.B. (1999). Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 969–975.
- Carmen, J.C., and Sinai, A.P. (2007). Suicide prevention: Disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Mol. Microbiol.* 64, 904–916.
- Catalá, M., Gasulla, F., Pradas del Real, A.E., García-Breijo, F., Reig-Armiñana, J., and Barreno, E. (2010). Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. *BMC Microbiol.* 10, 297.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 13, 994–1002.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell Death : Critical Control Points Review. 116, 205–219.
- Duperron, S., Bergin, C., Zielinski, F., Blazejak, a, Pernthaler, a, McKiness, Z.P., DeChaine, E., Cavanaugh, C.M., and Dubilier, N. (2006). A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia : Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environ. Microbiol.* 8, 1441–1447.
- Elisabeth, N.H., Gustave, S.D.D., and Gros, O. (2012). Cell proliferation and apoptosis in gill filaments of the lucinid *Codakia orbiculata* (Montagu, 1808) (Mollusca: Bivalvia) during bacterial decolonization and recolonization. *Microsc. Res. Tech.* 75, 1136–1146.
- Estévez-Calvar, N., Romero, A., Figueras, A., and Novoa, B. (2013). Genes of the mitochondrial apoptotic pathway in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* 8, e61502.
- Farcy, E., Fleury, C., Lelong, C., Dubos, M.P., Voiseux, C., Fiévet, B., and Lebel, J.M. (2008). Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Mar. Environ. ...* 66, 300–308.
- Feig, C., and Peter, M.E. (2007). How apoptosis got the immune system in shape. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1, S61–S70.
- Fiala-Médioni, A., McKiness, Z.P., Dando, P., Boulegue, J., Mariotti, A., Alayse-Danet, A.M., Robinson, J., and Cavanaugh, C. (2002). Ultrastructural, biochemical, and immunological characterization of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid-Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Mar. Biol.* 141, 1035–1043.
- Goedken, M., Morsey, B., Sunila, I., Dungan, C., and De Guise, S. (2005). The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* 24, 177–183.
- Goodson, M.S., Crookes-Goodson, W.J., Kimbell, J.R., and McFall-Ngai, M.J. (2006). Characterization and role of p53 family members in the symbiont-induced light organ. *Biol. Bull.* 211, 7–17.
- Guezi, H., Boutet, I., Andersen, A., Lallier, F., and Tanguy, A. (2014). Comparative analysis of symbiont ratios and gene expression in natural populations of two *Bathymodiolus* mussel species. *Symbiosis* 63, 19–29.
- Hawkins, T.D., Bradley, B.J., and Davy, S.K. (2013). Nitric oxide mediates coral bleaching through an apoptotic-like cell death pathway: evidence from a model sea anemone-dinoflagellate symbiosis. *FASEB J.* 27, 4790–4798.

- Hückelhoven, R. (2004). BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 9, 299–307.
- Jensen, F.B. (2001). Comparative analysis of autoxidation of haemoglobin. *J. Exp. Biol.* 204, 2029–2033.
- Jessen-Eller, K., Kreiling, J. a, Begley, G.S., Steele, M.E., Walker, C.W., Stephens, R.E., and Reinisch, C.L. (2002). A new invertebrate member of the p53 gene family is developmentally expressed and responds to polychlorinated biphenyls. *Environ. Health Perspect.* 110, 377–385.
- Kelley, M.L., Winge, P., Heaney, J.D., Stephens, R.E., Farrell, J.H., Van Beneden, R.J., Reinisch, C.L., Lesser, M.P., and Walker, C.W. (2001). Expression of homologues for p53 and p73 in the softshell clam (*Mya arenaria*), a naturally-occurring model for human cancer. *Oncogene* 20, 748–758.
- Kiss, T. (2010). Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* 15, 313–321.
- Lushchak, V.I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30.
- McCord, J.M., Keele, B.B., and Fridovich, I. (1971). An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 1024–1027.
- Opferman, J.T., and Korsmeyer, S.J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat. Immunol.* 4, 410–415.
- Pannebakker, B. a, Loppin, B., Elemans, C.P.H., Humblot, L., and Vavre, F. (2007). Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 213–215.
- Romero, A., Estévez-Calvar, N., Dios, S., Figueras, A., and Novoa, B. (2011). New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* 6, e17003.
- Sunila, I., and LaBanca, J. (2003). Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Organ.* 56, 163–170.
- Tait, S.W., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Cell Biol.* 11, 621–632.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344.
- Vaux, D.L., and Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245–254.
- Wang, Y., and Ruby, E.G. (2011). The roles of NO in microbial symbioses. *Cell. Microbiol.* 13, 518–526.
- Yang, B., Johnson, T.S., Thomas, G.L., Watson, P.F., Wagner, B., Furness, P.N., and El Nahas, a. M. (2002). A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 62, 1301–1313.

## Tables

**Table 1:** Genes name, function and primer sequences used for mRNA quantification by real-time PCR in hydrothermal vent mussels *Bathymodiolus azoricus*.

Gene Name	role	Mechanism	Primers Sequences (5'-3')
Kappa B-Ras	anti-apoptotic		For: TGGTGTGGTCGTGATCGTCTAGTA Rev: GGAAGAAACCTGAGTACCCAGAAA
BCL2 (B-cell lymphoma-2)	anti-apoptotic	Intrinsic mechanism	For: AGCTGGGACCCGGTATTTAGTAGT Rev: AACTCCTGTTTGAACCTCTCTTCG
Inhibitor of Apoptosis Proteins 1 (IAP1)	anti-apoptotic	Intrinsic mechanism	For: ATGCCAGGTCCAAACATTAGAGAT Rev: CACTCTCCAAACGTTCTATCCTC
Inhibitor of Apoptosis Proteins 2 (IAP2)	anti-apoptotic	Intrinsic mechanism	For: TAGACGATGTTGTTAGGTGCCACT Rev: ACTGTTGCACAAATTGGTGGTTAG
Macrophage Inhibitory Factor (MIF)	anti-apoptotic	Cytokine pathway	For ATTGCTGTTGAAGTAGCAGCATTC Rev AGCCAATTTAAGGATCACTTCTGC
Bax inhibitor	anti-apoptotic	Intrinsic mechanism	For: TGGTTAGCAGCTACACATCATTCA Rev: CCTCCCATGTATAAAAAGGTCCTG
Apoptotic Inhibitory Factor Mitochondrial 1 (AIF1mito)	pro-apoptotic	Intrinsic mechanism	For: TAGAGGCATTGGCATTACTTTTCC Rev: GACATTATTTTGGCGAGATGTACG
TNF receptor associated factor 4 (TNFrec4)	pro-apoptotic	Extrinsic mechanism	For: TCAGGGAAGTGTCCATTTGAAGTA Rev: GGGACATTGGTACTGATGAGTCTG
38 Mitogen Activated Protein Kinase (38MAPK)	pro-apoptotic	/	For: GGAAGTAGTGCCCGAATTTTTG Rev: AGGGGACAGGAGTTGATATCTTTG
TNF alpha induced protein (TNF- $\alpha$ ind)	pro-apoptotic	Extrinsic mechanism	For: CATTCAAAGGAGAAGCATCAGTTG Rev: TAGGGAATCCACCAACGTTTAGTT
P63/P73	pro-apoptotic	Intrinsic mechanism	For: CCCATACCATAATGTCACAAGCAT Rev: GTAATCTCCTCCTTCTGGTGCAAT
P53 induced protein	pro-apoptotic	Intrinsic mechanism	For: GACCAGAAAATTATTGGGAGTTGG Rev: TAATGATGTCACTCTTCGCTCTC
Caspase2	pro-apoptotic	Extrinsic mechanism	For: CCTTGGATGATTGGAGATAATGGT Rev: TGTCTTTCCTTCTGTCAATTCTGG
Caspase9	pro-apoptotic	Intrinsic mechanism	For: ACACGTGGCTAATCCACTAAAACA Rev: TCTAGATCAGCAATGGGAGTGTC

Caspase8	pro-apoptotic	Extrinsic mechanism	For: ACGAATGACGCAGATTATGGTAGA Rev: TGGCATGACCTTCTTGTATTATCTC
Caspase7	pro-apoptotic	Extrinsic mechanism	For: GTTCACATGGAGCAGAAATACCAC Rev: ACCTTCAATTAGACATCGACATGC
Caspase6	pro-apoptotic	Extrinsic mechanism	For: AAAAGAACGGGACAAGGTAAACTG Rev: CATTTAATCCAGGACACTGTGAGG
Caspase10	pro-apoptotic	Extrinsic mechanism	For: GAACTGTCCATCACTAGCCTTGAA Rev: AGAAGTCAGCCTCTCGTGGTATTT
Super Oxide Dismutase 1 (SOD1)	ROS detoxication		For : GGATCACCTACTGATAGTAAACGGC Rev : GTCTAGCATGTACCACTATGGACCT
Super Oxide Dismutase 2 (SOD2)	ROS detoxication		For : CTCGTCAGTAAATGTAAACAGGGGAG Rev : CTCACCTCATCAGTTGGACTACCAT
Super Oxide Dismutase 3 (SOD3)	ROS detoxication		For : GACAGAGCACTACAGCTACCATAGA Rev : GGACTACACTGAGAAGGGTAATTTCC
Super Oxide Dismutase 4 (SOD4)	ROS detoxication		For : CTGATGGTCCAGTTAATCTCGACATC Rev : GTTGTTCATCTGGGTATAGTGAGG
Super Oxide Dismutase 5 (SOD5)	ROS detoxication		For : ACAGAGAGCAGTGTTACAGGGATAC Rev : GGAGATAAGCCATCCAATGTTCCATC
Super Oxide Dismutase 6 (SOD6)	ROS detoxication		For : GATAGGGAAACAGTTACAGTGCATC Rev : ATTTTCTGGAATGCTCTGTACTGC
Super Oxide Dismutase 7 (SOD7)	ROS detoxication		For : GCCCACATAAGACATATCGGTGATC Rev : CTAATCCCATATCGTCTGGTCCAAAG
Nitric Oxide Synthase 1 (NOS1)	NO synthesis		For : GATGGGATGGAAAGGACGTTATGG Rev : CAACCTCTAGTACTAATTCCGGGG
Nitric Oxide Synthase 2 (NOS2)	NO synthesis		For : CTCATCAGCCATGTTGAAGCTCC Rev : GTAGGAGTAGCATCAGGTGTCATG
Ribosomal L15 (RBL15)	Reference gene for qPCR		For:TATGGTAAACCTAAGACACAAGGAGT Rev: TGGAATGGATCAATCAAAATGATTTC

**Table 2:** Significant up- or down-regulated genes identified in basalt conditions (BT1, BT2, BT3) compared to natural population (T-test with 100 permutations).

	BT1/Nat pop	BT2/Nat pop	BT3/Nat pop	BT1/BT2	BT1/BT3	BT3/BT2
<b>Kappa B-Ras</b>	-	-				+
<b>BCL2</b>	-	-				+
<b>IAP1</b>		-			-	+
<b>IAP2</b>						
<b>MIF</b>	-	-				
<b>Bax inhibitor</b>	+	+	+			
<b>AIF1mito</b>	-	-			-	+
<b>TNFrec4</b>						
<b>38 MAPK</b>	-	-			-	+
<b>TNF-<math>\alpha</math> ind</b>	-	-				+
<b>P63/P73</b>						
<b>P53 induced protein</b>						
<b>Caspase2</b>			+			
<b>Caspase9</b>		-				+
<b>Caspase8</b>		-				+
<b>Caspase7</b>						
<b>Caspase6</b>		-				
<b>Caspase10</b>						
<b>SOD1</b>	+	+				+
<b>SOD2</b>	+	+				
<b>SOD3</b>	+	+				
<b>SOD4</b>	+	+				
<b>SOD5</b>	+	+	+			
<b>SOD6</b>	+	+	+			+
<b>SOD7</b>	+	+	+	-		+
<b>NOS1</b>	-	-				+
<b>NOS2</b>	-					

Nat pop: Natural population. In the comparison columns (X/Y), + indicates that the gene is significantly up-regulated in X compared to Y, and - indicate that the gene is significantly

down-regulated in X compared to Y. In orange: anti-apoptotic genes, in blue: pro-apoptotic genes.

**Table 3:** Significant up- or down-regulated genes identified in the translocated conditions compared to BT1 (T-test with 100 permutations).

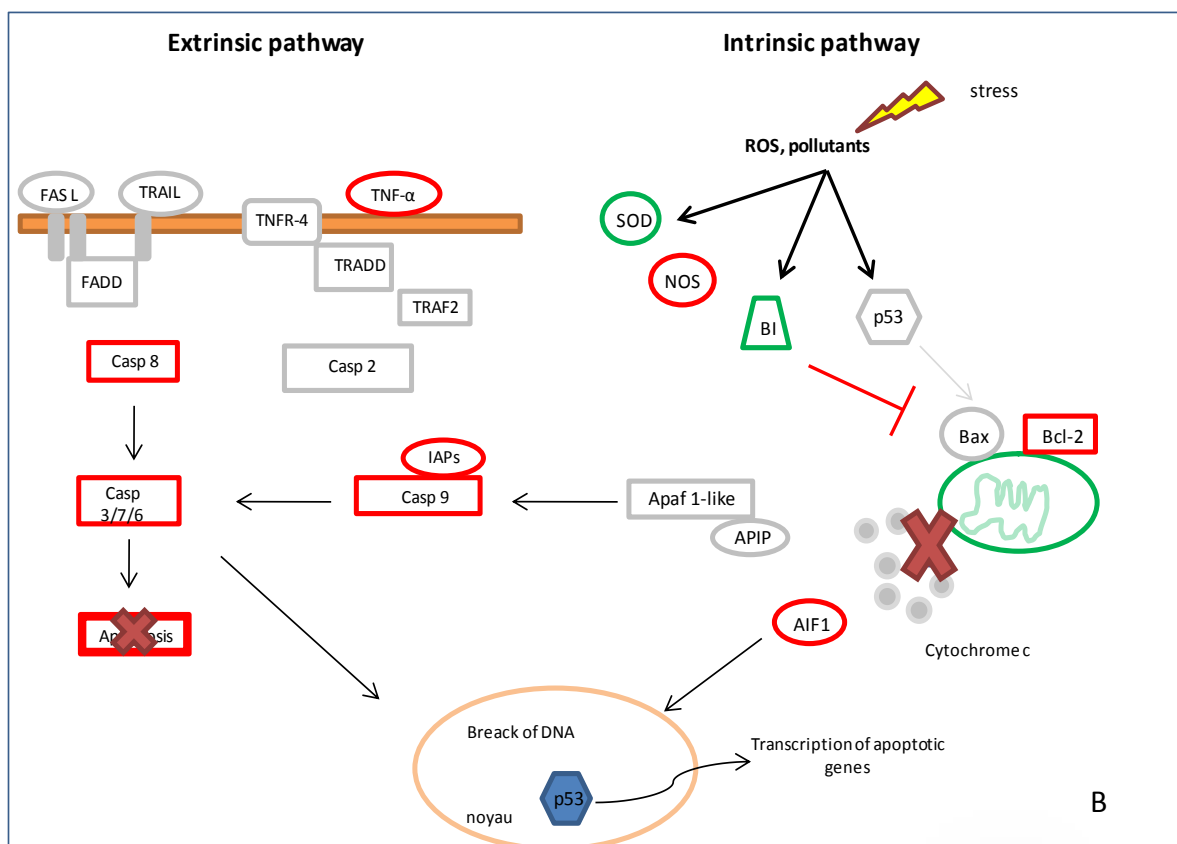
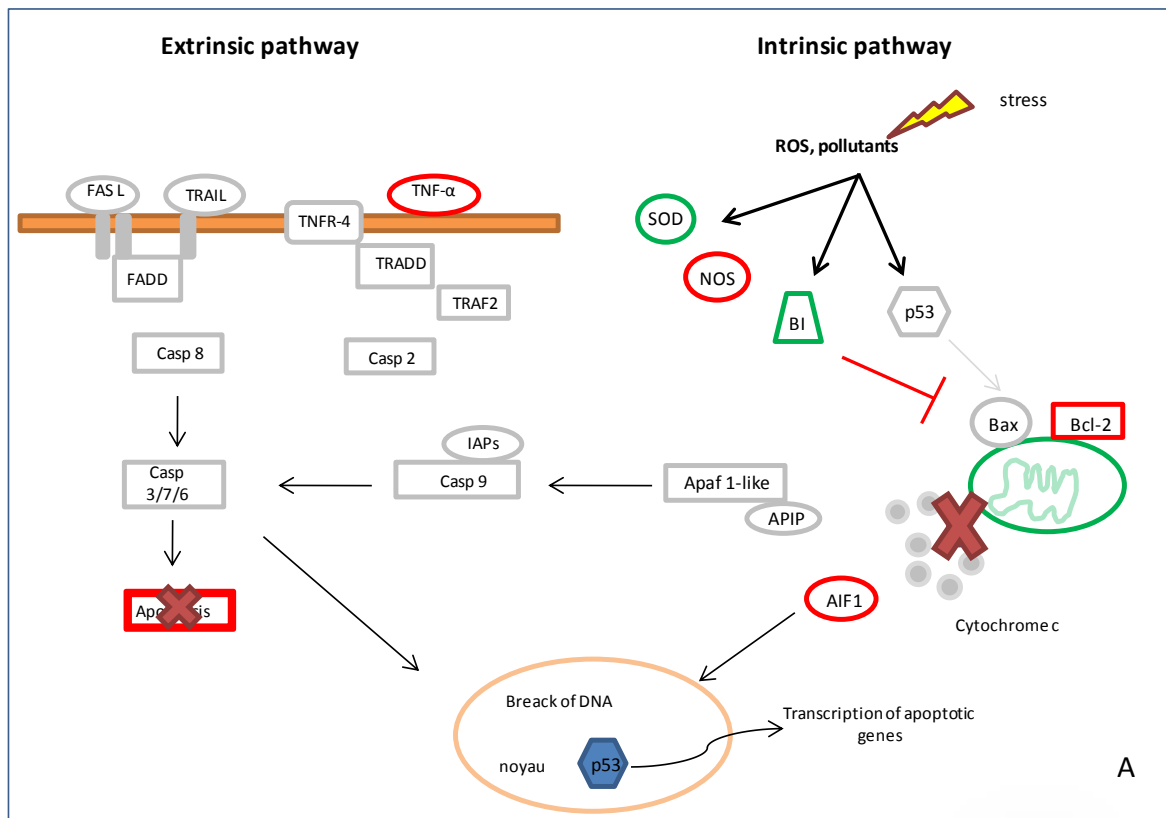
	TR1.2/BT1	TR1.3/BT1	TR1.2/TR1.3
<b>Kappa B-Ras</b>		+	
<b>BCL2</b>		+	-
<b>IAP1</b>		+	-
<b>IAP2</b>		+	-
<b>MIF</b>			
<b>Bax inhibitor</b>			
<b>AIF1mito</b>		+	-
<b>TNFrec4</b>			
<b>38 MAPK</b>		+	-
<b>TNF-<math>\alpha</math> ind</b>		+	-
<b>P63/P73</b>		+	
<b>P53 induced protein</b>			
<b>Caspase2</b>			
<b>Caspase9</b>		+	-
<b>Caspase8</b>		+	-
<b>Caspase7</b>			
<b>Caspase6</b>		+	-
<b>Caspase10</b>			
<b>SOD1</b>		+	-
<b>SOD2</b>		+	-
<b>SOD3</b>		+	-
<b>SOD4</b>		+	-
<b>SOD5</b>	+		
<b>SOD6</b>			

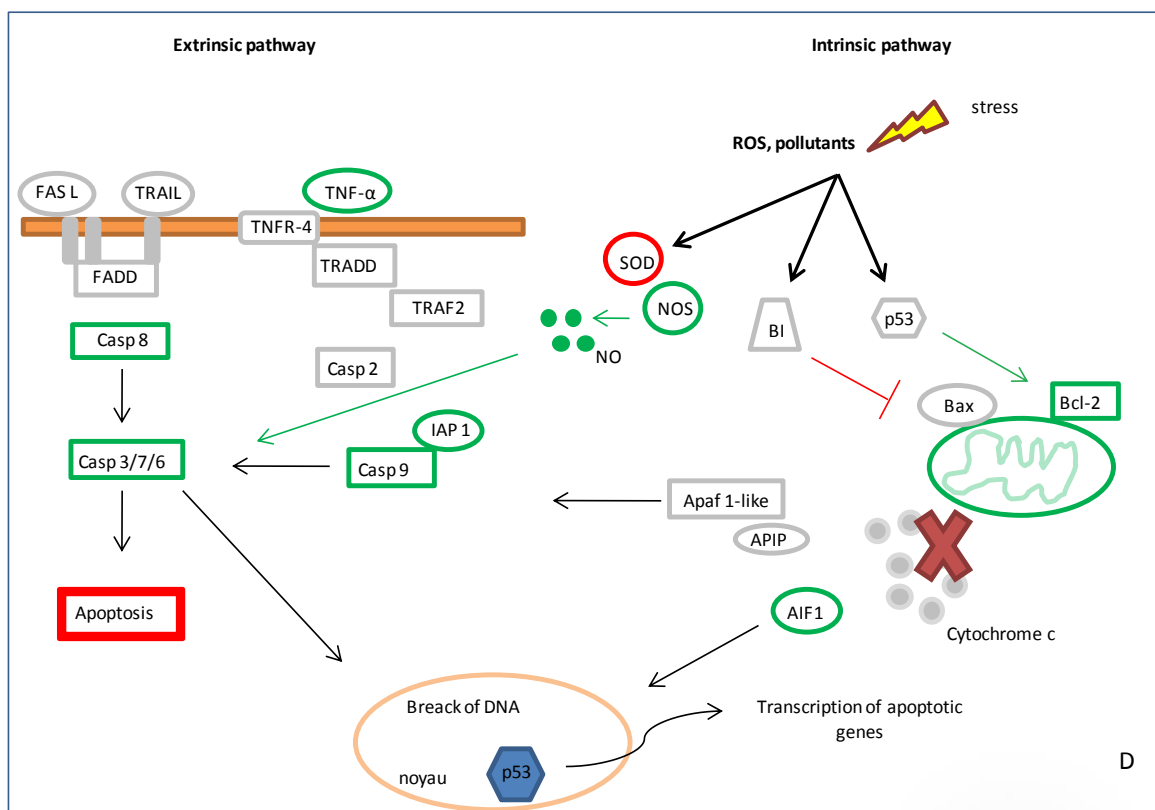
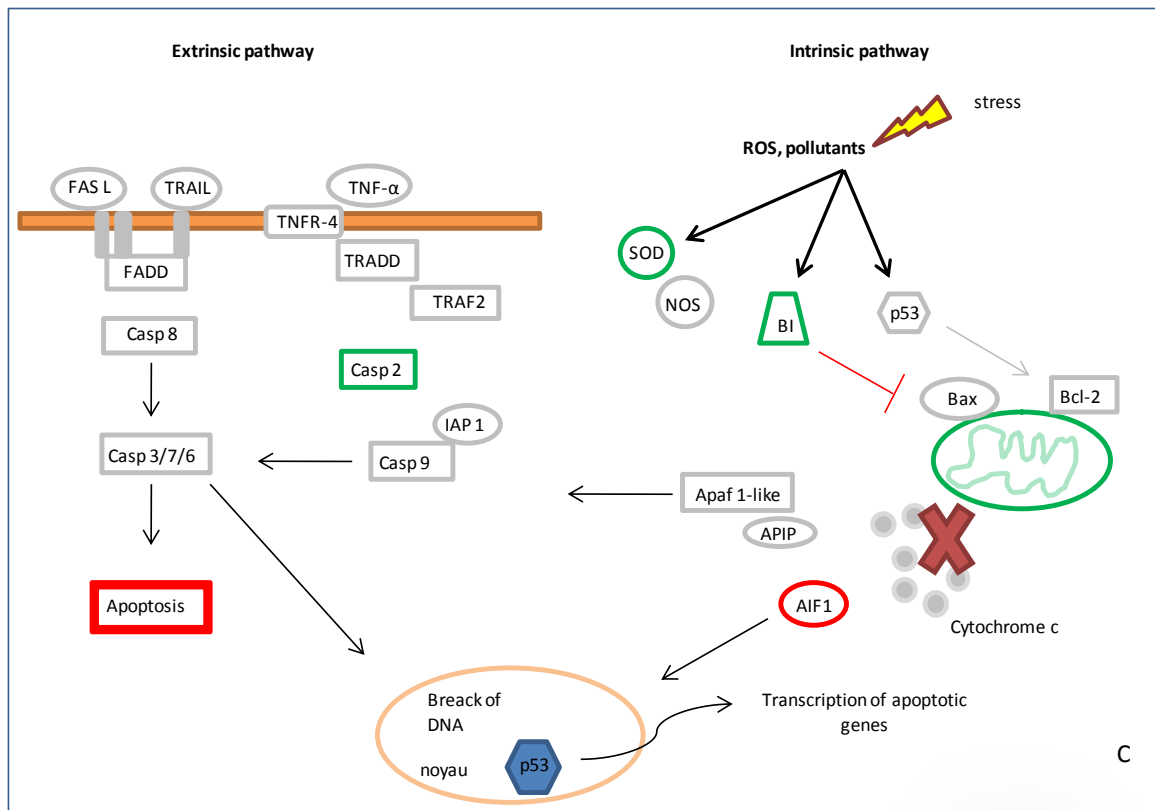
<b>SOD7</b>		+	
<b>NOS1</b>		+	-
<b>NOS2</b>		+	

In the comparison columns (X/Y), + indicates that the gene is significantly up-regulated in X compared to Y, and - indicates that the gene is significantly down-regulated in X compared to Y. In orange: anti-apoptotic genes, in blue: pro-apoptotic genes.



## Figures





**Figure 1:** Schematic representation of major signalling pathways involved in apoptosis based on data obtained from both *Mytilus galloprovincialis* and *Bathymodiolus azoricus*. A: comparison between BT1 and natural population, B: comparison between BT2 and natural population, C: comparison between BT3 and natural population, D: comparison between TR1.3 and BT1. Green: up-regulated genes Red: down-regulated genes. Genes are differentially expressed in A, B, C compared to the one in natural population and in D compared to the one in BT1.

ROS: Reactive Oxygen Species, NOS: Nitric oxide synthase NO: Nitric Oxide BI: Bax Inhibitor; Apaf: Apoptotic protease activatig factor; AIP: Apaf interacting protein, Casp: Caspase, IAP: Inhibitor of Apoptosis, AIF: Apoptosis-inducing factor, TRAF: TNF Receptor-Associated Factor, TRADD: Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain protein, TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor, FADD: Fass Associated Death Domain protein, FAS L: Fas Ligand, TRAIL: tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand



# Chapitre V

## Conclusions et perspectives

La symbiose, phénomène répandu dans le monde du vivant, fait l'objet de nombreuses études pour mettre en lumière ses mécanismes intimes. Si des schémas explicatifs globaux ont pu être proposés, notamment grâce à l'étude d'organismes modèles, des zones d'ombres persistent. Dans cette étude, nous nous sommes proposés d'identifier quelques acteurs moléculaires de la symbiose entre la moule hydrothermale *B. azoricus* et ses bactéries symbiotiques, sulfo-oxydantes et méthanotrophes. Pour cela, nous avons mis en place des manipulations *in situ* au fond de l'océan, aux abords des sources hydrothermales de la ride médio-Atlantique. La première étape de ces expériences a été de suivre la perte graduelle de la charge symbiotique chez les individus que nous avons éloignés du fluide hydrothermal, et donc des composés réduits qu'il contient, source de nutriments pour les bactéries symbiotiques. Les moules ainsi traitées correspondent à la condition « basalte ». Dans un second temps, nous avons suivi la ré-acquisition des symbiotes en réexposant des moules « basalte » au fluide hydrothermal en les repositionnant sur la moulière. Le questionnement associé à ces manipulations était le suivant :

- comparativement aux moules de la population naturelle, quelles sont les protéines dont l'expression va être modifiée suite à la perte de symbiote en condition basalte ?
- ces protéines jouent-elles un rôle dans la régulation de cette symbiose ?
- de même, le maintien ou la ré-acquisition de la charge symbiotique, après un retour sur site, met-il en jeu des mécanismes spécifiques de la part de l'hôte et, si tel est le cas, quels en sont les acteurs ?

Afin d'identifier des acteurs moléculaires impliqués dans ces processus, nous avons dans un premier temps mené une étude globale, combinant approches protéomique et transcriptomique, puis dans un second temps une étude ciblée sur des candidats potentiellement impliqués dans la régulation par l'hôte de cette symbiose. Cette deuxième partie nous a permis de formuler des hypothèses plus directes quant à l'implication de

certaines protéines dans cette association symbiotique. Notons que notre étude se focalise sur l'hôte et les processus que celui-ci peut mettre en place mais les processus d'acquisition et de régulation des symbiotes peuvent aussi être en partie mis en place par le symbiote lui-même. Dans l'interaction symbiotique entre le calmar *E. scolopes* (McFall-Ngai et al., 2013) et la bactérie *V. fischeri*, la toxine TCT est libérée par la bactérie lors de l'acquisition. De même une étude transcriptomique sur l'établissement de la symbiose chez les coraux *Acropora palmata* et *Montastraea faveolata* au stade larvaire (symbiose avec *symbiodinium*), suggère que le succès de la colonisation s'appuie principalement sur la capacité du symbiote à mettre en place des mécanismes pour ne pas être rejeté par l'hôte (Voolstra et al., 2009). Enfin, tout récemment, Sayavedra et collaborateurs ont montré que les bactéries sulfo-oxydantes vivant en symbiose avec des bathymodiales secrètent une toxine capable de protéger l'hôte contre des pathogènes (Sayavedra et al., 2015).

Le couplage des approches protéomique et transcriptomique n'est pas encore fréquent pour l'étude de systèmes complexes comme le sont les associations symbiotiques. Signalons cependant l'étude menée sur le rôle des hémocytes dans l'association sépiole/*V. fischeri* (Collins et al., 2012). Certaines études ont été menées uniquement à l'échelle protéique, notamment chez le calmar *E. scolopes* (Schleicher and Nyholm, 2011), le ver marin *Olavius algarvensis* (Kleiner et al., 2012b), ou encore dans l'association entre *Melilotus alba* et *Sinorhizobium meliloti* (Natera et al., 2000). Ces travaux ont révélé des protéines impliquées directement dans les interactions hôte-symbiotes (par exemple, protéine du Quorum sensing chez *E. scolopes*) ou dans des voies métaboliques spécifiques de ces associations (voie d'assimilation par le symbiote des déchets de l'hôte chez *Olavius algarvensis*). De même, de nombreuses études ont été menées au niveau des transcrits d'individus symbiotiques, tel que chez l'éponge *Cliona varians* (Riesgo et al., 2014), le puceron du pois (Nakabachi et al., 2005) ou encore dans l'association cnidaire/*Symbiodinium* (Rodriguez-Lanetty et al., 2006). Que l'analyse soit exclusivement à l'échelle protéique ou des transcrits, chacune de ces études globales ont mené à l'identification d'acteurs potentiels dans ces interactions.

Afin de répondre à mes objectifs de thèse, au sein de l'approche globale nous nous sommes focalisés sur les acteurs de l'immunité. En effet, en 2007 Margaret McFall-Ngai a émis l'hypothèse selon laquelle l'évolution de l'immunité chez certains organismes ne menait pas nécessairement à une meilleure efficacité pour combattre leurs pathogènes, mais permettait plutôt d'établir des relations spécifiques entre l'hôte et son microbiome (McFall-ngai, 2007). A partir de cette hypothèse, de nombreuses études et revues de la littérature ont vu le jour

confirmant l'implication du système immunitaire dans l'établissement, le maintien ou plus globalement dans la régulation de la symbiose (Chu and Mazmanian, 2013; Gross et al., 2009; Harvill, 2013; Kisseleva, 2014; Login and Heddi, 2013).

Les figures 5.1 et 5.2 présentent un résumé des résultats que nous avons obtenus en suivant l'approche globale. Trois hypothèses concernant les causes des changements métaboliques et de l'induction de réponses immunitaires sont représentées dans ces figures. La première correspond à la réponse de l'organisme à une perte de charge symbiotique et serait directement liée au changement d'état symbiotique de l'organisme. La seconde correspond à une réponse de l'organisme aux pathogènes de l'environnement (Hancock et al., 2006) tandis que la troisième correspond à une réponse au stress induit par le changement d'environnement. Cependant, deux études menées chez le mollusque *Haliotis tuberculata* montrent que la réponse immunitaire au stress est rapide et se traduit par une immunodépression dans les 15 premières minutes qui suivent le stress (Hooper et al., 2007; Malham et al., 2003). A la vue de nos résultats, le stress ne semble donc pas être le paramètre principal influençant la réponse des individus issus des expériences *in situ*. Il nous est cependant difficilement possible de discriminer entre la réponse individuelle liée à la symbiose et la réponse aux pathogènes potentiels. Ainsi nous n'excluons pas cette dernière possibilité, mais axerons nos hypothèses sur la réponse au changement d'état symbiotique. Nous avons ainsi observé une induction de protéines impliquées dans la voie Toll à l'échelle du transcrit dans les conditions basale. Cette voie est impliquée dans la reconnaissance et la lutte contre les bactéries Gram + et les champignons. Chez les bivalves (*M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *C. gigas*), Toubiana et co-auteurs (2014) ont montré une induction des acteurs de la voie Toll en réponse à un challenge bactérien. Ces acteurs ont été identifiés par homologie avec ceux présents chez la drosophile. Il est intéressant de noter que chez les bivalves, la réponse aux pathogènes n'active pas tous les acteurs de la voie, mais que d'autres voies de cascade peuvent être activées à partir des récepteurs Toll. Prenons l'exemple de la moule méditerranéenne (*M. galloprovincialis*) chez laquelle l'infection par un champignon induit uniquement l'expression des protéines TLR et MyD88 au sein de la voie Toll (Toubiana et al., 2014). Ceci suggère l'utilisation d'une autre cascade encore inconnue en aval. En effet, il a été démontré que la voie Toll est liée à d'autres voies de signalisation comme la voie MAP kinase et est soumise à des régulations *via* notamment des tyrosines kinases, phosphatases et glucocorticoïdes (O'Neill, 2008). De plus, Franzenburg et collaborateurs (2012) ont mis en évidence l'implication de l'association TLR/MyD88 dans le

maintien de l'homéostasie de la relation hôte-symbiote chez l'hydre (Franzenburg et al., 2012). Nos résultats de transcriptomique montrent une surexpression des TLR 1 et 13 ainsi que de la protéine MyD88 et d'un inhibiteur de la voie NF-κB. Ceci, conformément à l'hypothèse émise par Toubiana, Franzenburg et collaborateurs, pourrait suggérer dans notre cas, une implication de l'association TLR/MyD88 dans l'homéostasie de la relation hôte-symbiotes *via* une voie non NF-κB-dépendante.

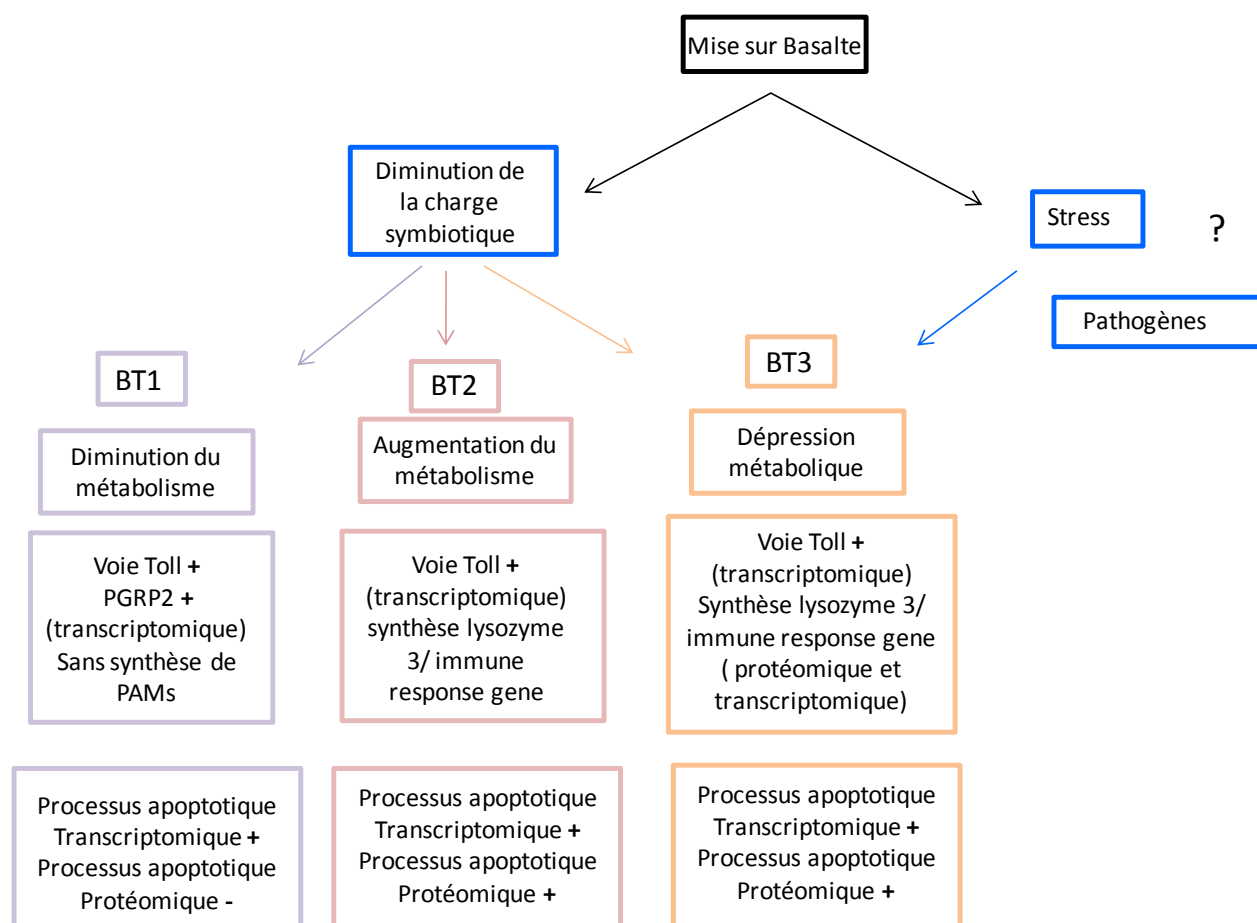


Figure 5.1 : Schéma récapitulatif des hypothèses et conséquences de la mise sur le basalte et de la perte de symbiotes sur le métabolisme et l'immunité de l'hôte.



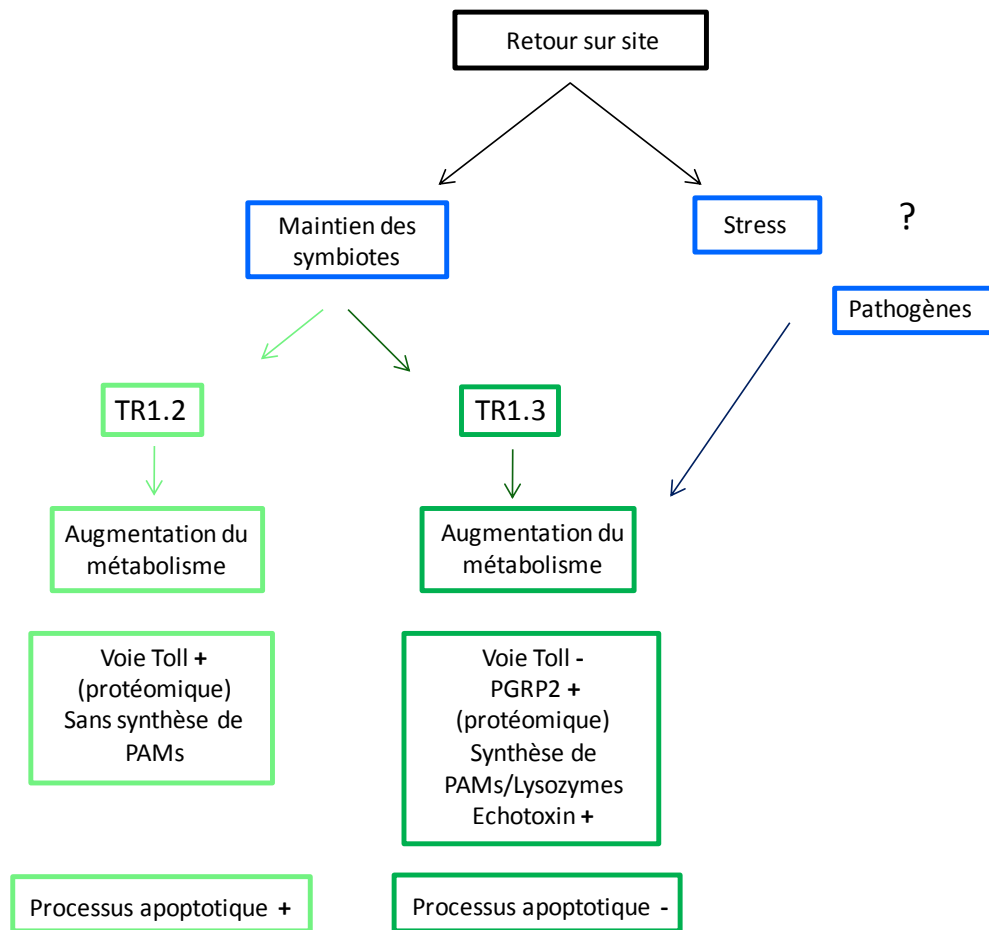


Figure 5.2 : Schéma récapitulatif des hypothèses et conséquences du retour sur site et du maintien de la charge symbiotique sur le métabolisme et l'immunité de l'hôte.

Parallèlement à la surexpression de récepteurs associés à la voie Toll, nous avons observé une surexpression de la protéine PGRP2 dans la population naturelle et dans la condition TR1.3. Les protéines PGRPs ont pour fonction de reconnaître et, dans certains cas, de cliver le peptidoglycane présent dans la paroi bactérienne. Chez les invertébrés, c'est chez la drosophile que les PGRPs ont été le mieux décrites ; certaines ont été identifiées comme étant liées à la voie Imd et d'autre à la voie Toll. Chez les bivalves, bien que les PGRPs aient été identifiées comme impliquées dans la réponse immunitaire, aucun lien direct n'a été formulé entre les PGRPs et les voies NF- $\kappa$ B dépendantes (Toll ou Imd). Cependant, de nombreuses autres études révèlent l'implication des PGRPs dans des mécanismes de régulation de la symbiose (Anselme et al., 2006; Wang and Aksoy, 2012). Prenons l'exemple de Troll et co-auteurs qui suggèrent que le calmar *E. scolopes* synthétise, juste après la colonisation de son organe lumineux, la protéine Es-PGRP2 qui modulerait les interactions hôte/symbiotes au sein de cet organe (Troll et al., 2010). De même, une étude à l'échelle du transcrit chez le siboglinidae symbiotique *Ridgea piscesae* montre une surexpression des isoformes de PGRPs dans le trophosome (Nyholm et al., 2012). Chez *Bathymodiolus azoricus* nous avons pu identifier 5 isoformes de PGRPs. Par une approche ciblée, nous avons observé que, dans la population naturelle, les Ba-PGRP 1, 2 et 4 semblent impliquées dans la régulation des symbiotes et notamment dans leur dégradation lorsque leur taille ou densité au sein d'un bactériocyte est trop importante. Les Ba-PGRP 3 et 5 possèdent un peptide signal et seraient donc secrétées ; elles pourraient ainsi constituer un signal de colonisation pour les bactéries libres (Figure 5.3). Les résultats de l'approche globale et de l'approche ciblée sur les PGRPs montrent dans les deux cas une sous-expression d'au moins une isoforme PGRP après la mise sur le basalte des moules et la perte de leurs symbiotes. Si nous suivons les hypothèses que nous avons formulées dans la figure 5.3, la diminution de la charge symbiotique induirait une diminution de la synthèse des Ba-PGRPs 1, 2 et 4, la régulation de la charge n'étant plus nécessaire de par la difficulté du recrutement de bactéries SOX et MOX sur le basalte.

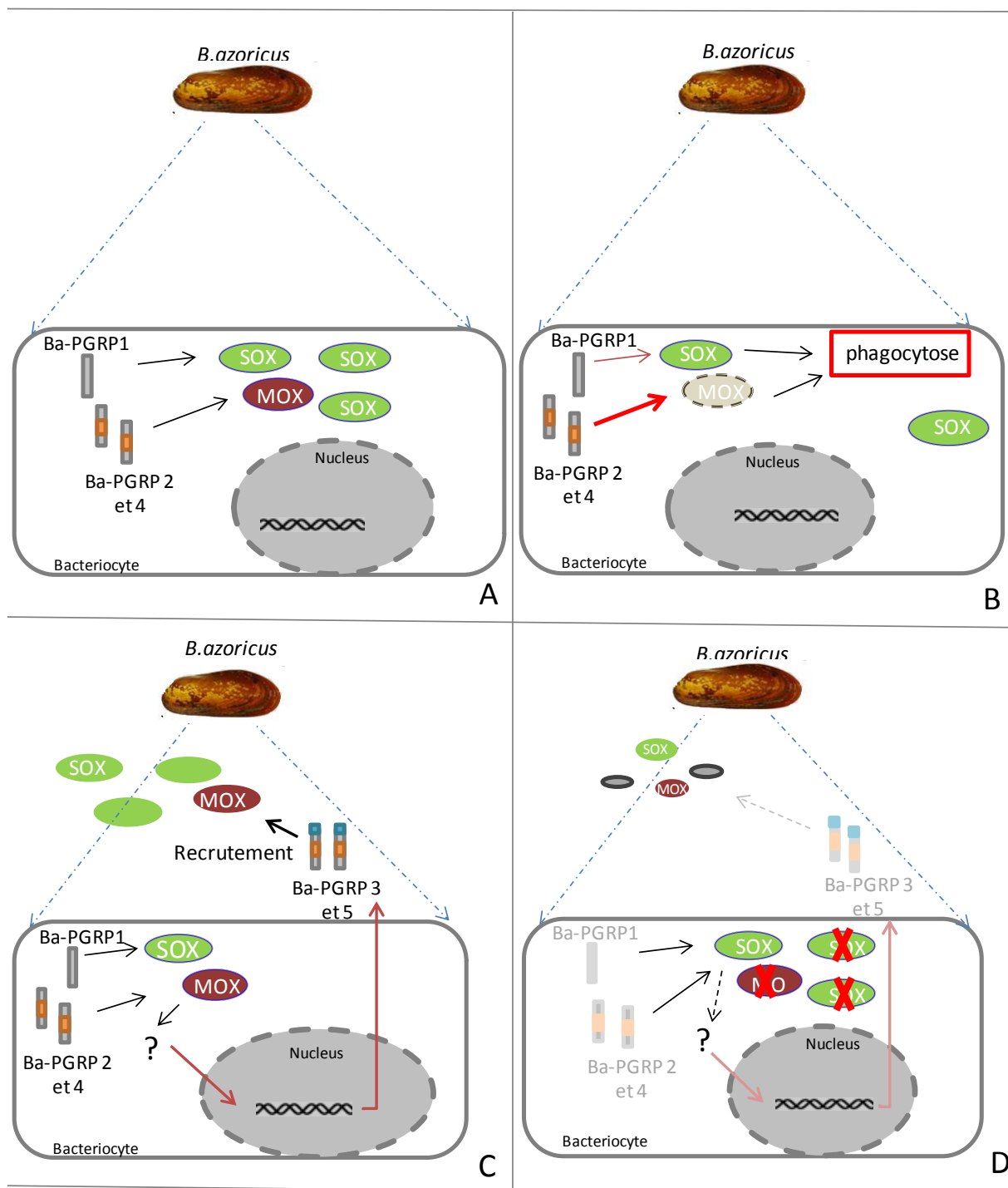


Figure 5.3 : Schéma simplifié des hypothèses formulées quant à la régulation de la symbiose dans un bacteriocyte dans la **population naturelle (A;B et C) et sur le basalte (D)** A. La reconnaissance des symbiotes SOX/MOX au sein du bacteriocyte et de leur densité est mise en place par les Ba-PGRPs 1, 2 et 4. B. Dans le cas où ces bactéries sont surnuméraires, les isoformes 2 et 4 lyse la paroi bactérienne, s’ensuit la phagocytose de ces bactéries C. Dans le cas où la densité symbiotique est trop faible, les Ba-PGRP 3 et 5 participent au recrutement. D. En condition basale, la diminution de la charge symbiotique induit une diminution de la synthèse des BA-PGRPs, la régulation n’étant plus nécessaire et le recrutement sur le basalte étant plus difficile.

Cependant, nous observons une surexpression de la protéine Ba-PGRP 2 en TR1.3, confortant une implication de cette isoforme dans une régulation de la charge symbiotique. La colonisation par les bactéries symbiotiques étant continue au cours de la vie de la moule (Wentrup et al., 2014), les processus impliqués dans l'acquisition devraient être activés en permanence. Or, les Ba-PGRP 3 et 5 sont sous-exprimées en l'absence de symbiotes. Une explication plausible est que - les bactéries SOX/MOX libres étant probablement moins présentes sur le basalte - en absence de réponse aux signaux envoyés *via* les Ba-PGRP 3 et 5, l'hôte diminue la synthèse de ces molécules signal. Pour confirmer ou non ces hypothèses, il reste nécessaire de mesurer l'expression relative des différentes isoformes dans différents tissus de *B. azoricus*, tel que le manteau, ou la glande digestive, pour établir une spécificité tissulaire potentielle en appui de leur rôle dans la symbiose. Les PGRPs sont connues pour être régulées en amont par des récepteurs des voies Toll et Imd. Qu'en est-il chez *B. azoricus* ? Quelles sont les voies d'activation de ces PGRPs ? Reconnaittent-elles directement les signaux envoyés par les bactéries symbiotiques ? La caractérisation et la compréhension complète de ces voies nous semble primordiale afin de définir leur implication dans les processus symbiotiques. L'utilisation de techniques de protéomique (MRM) et de transcriptomique (qPCR) ciblées sur ces voies de signalisation, chez des moules dans différents états symbiotiques, nous permettrait ainsi de confirmer ou non nos hypothèses.

Jusque là, nous avons émis des hypothèses quant aux protéines impliquées dans l'acquisition de la symbiose ou encore dans sa régulation. L'étude des lysozymes nous a permis de nous intéresser à la « cassure » (breakdown en anglais) de la symbiose - processus qui a notamment lieu lors du blanchiment des coraux - et à l'identification de protéines de l'hôte impliquées dans celui-ci. La famille des lysozymes a été choisie tout d'abord car le lysozyme 3 a été identifié dans l'approche globale en BT3 ainsi qu'en TR1.3. Les lysozymes sont des protéines impliquées dans le processus de lutte contre les bactéries et leur digestion. Nous avons identifié 6 isoformes d'I-type lysozymes chez *B. azoricus* et montré que l'expression du Ba-lysozyme 3 était d'une part plus importante dans les branchies que dans les autres tissus et d'autre part, était surexprimé durant la cinétique de perte de symbiote. Compte tenu de la double compétence des lysozymes, cela suggère un rôle de Ba-lysozyme 3 en BT3 dans la lutte contre les bactéries pathogènes (i) (Figure 5.4), ou bien dans la destruction par digestion des bactéries symbiotiques (ii) (Figure 5.4). Notons d'une part que de nombreuses études chez des bivalves non symbiotiques ont montré la surexpression de lysozymes suite à un challenge bactérien (Chu and La Peyre, 1989; Wang et al., 2013; Xue et al., 2010; Yue et al., 2011), et

d'autre part, que notre étude nous a permis d'observer la surexpression en BT3 et TR1.3 de gènes impliqués dans la réponse immunitaire (PAMs ou protéines). De plus, Zielinski et collaborateurs (2009) ont montré chez plusieurs espèces de bathymodiales que les noyaux des cellules de la majorité des tissus étaient infectés par une bactérie, *Ca. Endonucleobacter bathymodioli*, à l'exception notable des cellules des branchies (Zielinski et al., 2009). Les auteurs ont ainsi formulé l'hypothèse que les branchies seraient protégées contre l'infection par les bactéries symbiotiques qui les habitent. Cette hypothèse s'est trouvée récemment confortée par Sayavedra et collaborateurs (2015). En effet, ils ont montré que les bactéries symbiotiques de types SOX secrètent des toxines qui semblent capables de protéger l'hôte contre la colonisation par des bactéries ou eucaryotes pathogènes (Sayavedra et al., 2015). Des résultats similaires quant à la protection de l'hôte par le symbiote ont été observés dans la symbiose insecte/*Wolbachia* (Brownlie and Johnson, 2009). Ces résultats vont plutôt dans le sens de l'hypothèse (i) (Figure 5.4). Cependant, nous avons pu observer dans le chapitre III, consécutivement à la mise sur le basalte, un fort impact sur le métabolisme de l'hôte suggérant un besoin rapide de nutriments. De plus, des études sur le mode de nutrition des Bathymodiolinae montrent que l'hôte peut avoir accès aux nutriments *via* la digestion de ses propres symbiotes à travers le système lysozyme/lysosome (Fiala-Medioni et al., 1994). De même, l'étude de l'implication des lysozymes dans de nombreuses associations symbiotiques suggère un rôle de ceux-ci dans la régulation des symbiotes (Kim et al., 2014; Nakabachi et al., 2005; Nishikori et al., 2009). Ces derniers éléments vont plutôt dans le sens de l'hypothèse (ii) (Figure 5.4). Notons que la surexpression des lysozymes et peptides antimicrobiens après le retour sur moulière en TR1.3 ne soutient aucune de ces hypothèses. Afin de confirmer ou d'infirmer l'une et/ou l'autre de ces hypothèses, il serait nécessaire de mesurer l'activité de chaque isoforme, et donc de les purifier, ainsi que d'observer en histologie des phénomènes de digestion des symbiotes par microscopie électronique.

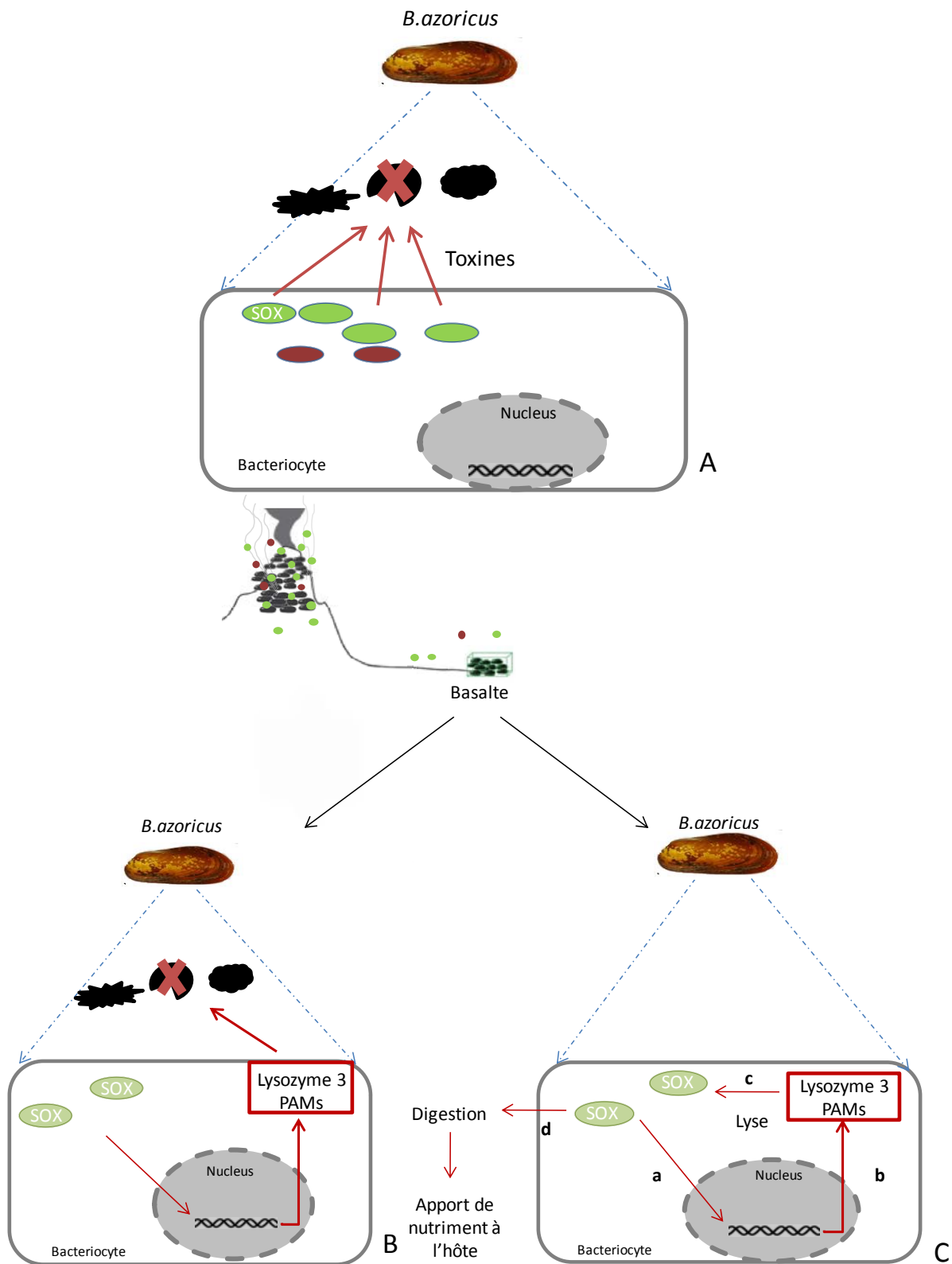


Figure 5.4 : Schéma simplifié de l'action du lysozyme 3 dans la diminution de la charge symbiotique. A. **En population naturelle**, ce sont les bactéries SOX qui envoient des toxines empêchant l'invasion de bactéries ou eucaryotes pathogènes. B. **Sur le basalte**, la chute du nombre de bactérie, et leur potentiel incapacité à lutter contre les pathogènes, induit une augmentation des réponses immunitaires de l'hôte (hypothèse i) et C. représentation de l'hypothèse (ii) ou l'hôte se débarrasse de ces bactéries *via* le système lysozyme-lysosome avec a: Reconnaissance des bactéries qui jeûnent b: Transcription de Ba-lysozyme 3 et peptides antimicrobiens c: Lyse des bactéries symbiotiques et d: digestion par phagocytose

Enfin, l'analyse des résultats globaux nous a permis d'observer une induction des processus apoptotiques sur le basalte aux temps T2 et T3 ainsi qu'en TR1.2. Les processus apoptotiques sont essentiels au maintien de l'homéostasie au sein d'un tissu, et sont induits lors de stress environnementaux (polluants, UV....) ou maladies. Ils ont en effet été identifiés comme des acteurs importants dans l'homéostasie du système immunitaire (Romero et al., 2015). Chez les bivalves, de nombreux exemples d'induction de l'apoptose ont été observés suite à des challenges bactériens ou à des stress de type polluant (notamment chez des espèces d'intérêt économique telles que *C. gigas*, *M. edulis* ou *M. galloprovincialis*) (Hagger et al., 2005; Kefaloyianni, 2005; Meistertzheim et al., 2007; Micić et al., 2002). Dans la symbiose, l'apoptose est souvent induite lors de la morphogénèse d'organes ou de tissus symbiotiques, chez *R. pachyptila* ou *E. scolopes* par exemple (Foster et al., 2000; Nussbaumer et al., 2006). Chez *B. thermophilus*, Guezi et co-auteurs (non publié) ont montré que la densité de bactéries symbiotiques était régulée par l'hôte *via* des mécanismes apoptotiques. Dans l'approche ciblée que nous avons menée, il semblerait que l'induction apoptotique, après une perte symbiotique importante, permette plutôt le remaniement de l'épithélium branchial ou la destruction de cellules contenant des symbiotes mourants (Weis, 2008). En effet, en BT3, nous pouvons émettre l'hypothèse que de nombreux bactériocytes n'ont plus de symbiotes et n'ont donc plus de rôle en tant que cellule hôte d'où leur destruction par l'organisme. Au contraire, pour les individus transloqués, le retour sur site induit une prolifération importante des symbiotes, qui pourrait être canalisée limitée par des processus apoptotiques.

Ces travaux de thèse nous ont permis d'identifier à différentes échelles des acteurs probablement impliqués dans des mécanismes de régulation de la symbiose entre *B. azoricus* et les bactéries de types SOX et MOX. Certains semblent plutôt impliqués dans des processus de communication hôte-symbiotes et d'acquisition (Ba-PGRP3 et 5) quand d'autres semblent plutôt impliqués dans la régulation de cette symbiose (Ba-lysozyme 3, Ba-PGRP1, 2 et 4, balance entre acteurs pro et anti-apoptotiques) ou encore dans l'homéostasie des relations hôte-symbiote (TLR/MyD88). De plus, ces travaux nous auront permis d'identifier et de caractériser de nombreux acteurs de l'immunité chez *Bathymodiolus azoricus*.

Cependant, l'analyse des résultats reste partielle, d'une part car la fonction de nombreux protéines et transcrits ne sont pas encore connue, d'autre part car il apparaît que certaines voies métaboliques ne sont représentées dans nos profils d'expression que par un nombre limité de gènes. Ce manque de données pourra être levé dès que le génome de *B. azoricus* sera disponible. De plus l'approche globale menée dans cette étude se heurte aux limites de

chacune des techniques utilisées. Au niveau transcriptomique, les analyses comparatives *via* les puces à ADN ne permettent une détection de gènes que si le différentiel d'expression au sein des différentes conditions est important et que les données au sein d'une même condition sont homogènes. Dans le cas contraire, à savoir en cas d'hétérogénéité au sein d'une condition, ce qui est commun, ou dans le cas de faible différentiel d'expression, les gènes ne seront pas identifiés comme différentiellement régulés. Au niveau protéomique, seules les protéines identifiées avec deux peptides et avec un indice de confiance élevé ont été gardées dans l'analyse. Cependant, certaines protéines très abondantes dans les cellules branchiales (actine, tubuline, protéines ribosomales), masquent le signal des protéines moins abondantes. Ainsi, seules les protéines suffisamment abondantes seront détectées, avec un seuil de détection lié à chaque protéine et chaque peptide en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

De plus, une grande partie de ce travail de thèse est focalisée sur le tissu symbiotique qu'est la branchie. Les hypothèses que nous avons pu émettre sont donc centrées sur les cellules hébergeant les symbiotes. Cependant, la branchie est un tissu complexe, constitué à la fois de cellules spécifiques mais aussi d'un nombre important d'hémocytes circulants. Les hémocytes sont présent dans l'hémolymphe qui, chez les bivalves, circule au sein de l'organisme *via* un système circulatoire ouvert. Les hémocytes sont connus pour contenir de nombreuses protéines impliquées dans l'immunité telles que les lectines, des protéines lysosomales, et des peptides antimicrobiens. (Canesi et al., 2002). Ainsi dans notre étude nous ne pouvons pas discriminer entre une réponse immunitaire des hémocytes ou des cellules branchiales. Afin de valider ou non nos hypothèses quant aux rôles de certaines protéines du système immunitaire dans la symbiose, un nouvel échantillonnage à Montségur, Lucky Strike, devra être mis en place. Il serait en effet intéressant, avant dissection des branchies de prélever l'hémolymphe ainsi que le mucus associé aux branchies, ce qui n'a pas été fait lors de la campagne d'échantillonnage de 2013. Le mucus pourrait en effet, être un vecteur fondamental de toxines ou des molécules chimio-attractantes impliquées dans la communication hôte-symbiotes lors de l'acquisition (tel est le cas dans l'association *E. scolopes/V. fischeri*) (Nyholm and McFall-Ngai, 2004; Nyholm et al., 2000). L'étude de l'expression des gènes de l'immunité dans les branchies et les hémocytes ainsi que dans les autres tissus de l'organisme nous permettrait d'identifier les acteurs de l'immunité exprimés spécifiquement dans le tissu symbiotique et de formuler des hypothèses plus robustes quant à l'implication de ces gènes dans la symbiose. De plus, l'échantillonnage sur des manipulations *in situ* devrait être refait selon une cinétique



plus rapprochée, notamment dans les premiers jours qui suivent la mise à l'écart des sorties de fluide, sur le basalte.

Dans cette étude, nous avons pris le parti de nous intéresser aux processus immunitaires, du fait de la publication de nombreuses études soulignant l'importance de ces processus dans la régulation des mécanismes symbiotiques. Cependant nous avons pu observer que de nombreux gènes n'ayant pas d'homologues dans les banques de données se trouvent différenciellement exprimés lors de la variation de l'état symbiotique. Ces gènes, spécifiques à notre organisme d'étude, nous semblent être d'excellents candidats dans la recherche d'acteurs moléculaires impliqués dans la symbiose chez *B. azoricus*. Il serait ainsi particulièrement intéressant d'approfondir ces résultats, en étudiant spécifiquement ces différentes protéines, afin de découvrir leurs fonctions et d'en déduire un rôle ou non dans la symbiose.

# Bibliographie

- Abu-Hamad, S., Sivan, S., and Shoshan-Barmatz, V. (2006). The expression level of the voltage-dependent anion channel controls life and death of the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5787–5792.
- Adema, C.M., Hertel, A., Miller, R.D., and Loker, E. s. (1997). A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate. *Proc. Natl.Acad.Sci.* *94*, 8691–8696.
- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 745–756.
- Allam, B., Paillard, C., and Auffret, M. (2000). Alterations in Hemolymph and Extrapallial Fluid Parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Challenged with the Pathogen *Vibrio tapetis*. *J. Invertebr. Pathol.* *76*, 63–69.
- Amson, R., Pece, S., Lespagnol, A., Vyas, R., Mazzarol, G., Tosoni, D., Colaluca, I., Viale, G., Rodrigues-Ferreira, S., Wynendaele, J., et al. (2011). Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat. Med.* *18*, 91–99.
- Anju, a, Jeswin, J., Thomas, P.C., and Vijayan, K.K. (2013). Molecular cloning, characterization and expression analysis of F-type lectin from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol.* *35*, 170–174.
- Anselme, C., Vallier, A., Balmand, S., Fauvarque, M.-O., and Heddi, A. (2006). Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Appl. Environ. Microbiol.* *72*, 6766–6772.
- Anselme, C., Pérez-Brocal, V., Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Charif, D., Latorre, A., Moya, A., and Heddi, A. (2008). Identification of the weevil immune genes and their expression in the bacteriome tissue. *BMC Biol.* *6*, 43.
- Arndt, C., Gaill, F., Felbeck, H., Bernard, S., and Jolla, L. (2001). anaerobic sulfur metabolism in thiotrophic symbioses. *J. Exp. Biol.* *204*, 741–750.
- Bachali, S., Jager, M., Hassanin, A., Schoentgen, F., Jollès, P., Fiala-Medioni, A., and Deutsch, J.S. (2002). Phylogenetic analysis of invertebrate lysozymes and the evolution of lysozyme function. *J. Mol. Evol.* *54*, 652–664.
- Balzano, S., Corre, E., Decelle, J., Sierra, R., Wincker, P., Da Silva, C., Poulain, J., Pawlowski, J., and Not, F. (2015). Transcriptome analyses to investigate symbiotic relationships between marine protists. *Front. Microbiol.* *6*, 98.
- Bao, Y., Shen, H., Zhou, H., Dong, Y., and Lin, Z. (2013). A tandem-repeat galectin from blood clam *Tegillarca granosa* and its induced mRNA expression response against bacterial challenge. *Genes Genomics* *35*, 733–740.
- Barbé, F., Douglas, T., and Saleh, M. (2014). Advances in Nod-like receptors (NLR) biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* *25*, 681–697.

- Barros, I., Divya, B., Martins, I., Vandeperre, F., Santos, R.S., and Bettencourt, R. (2015). Post-capture immune gene expression studies in the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* acclimatized to atmospheric pressure. *Fish Shellfish Immunol.* *42*, 159–170.
- Barry, J.P., Buck, K.R., Kochevar, R.K., Nelson, D.C., Fujiwara, Y., Goffredi, S.K., and Hashimoto, J. (2002). Methane-based symbiosis in a mussel, *Bathymodiolus platifrons*, from cold seeps in Sagami Bay, Japan. *Invertebr. Biol.* *121*, 47–54.
- Bathige, S.D.N.K., Umasuthan, N., Whang, I., Lim, B.-S., Jung, H.-B., and Lee, J. (2013). Evidences for the involvement of an invertebrate goose-type lysozyme in disk abalone immunity: Cloning, expression analysis and antimicrobial activity. *Fish Shellfish Immunol.* *35*, 1369–1379.
- Baumann, P., Lai, C., Baumann, L., Rouhbakhsh, D., Moran, N.A., and Clark, M.A. (1995). MINIREVIEW Mutualistic Associations of Aphids and Prokaryotes : Biology of the Genus *Buchnera*. *61*, 1–7.
- Beller, H.R., Chain, P.S.G., Letain, T.E., Chakicherla, A., Larimer, F.W., Richardson, P.M., Coleman, M. a, Wood, A.P., and Kelly, D.P. (2006). The genome sequence of the obligately chemolithoautotrophic, facultatively anaerobic bacterium *Thiobacillus denitrificans*. *J. Bacteriol.* *188*, 1473–1488.
- Bettencourt, R., Pinheiro, M., Egas, C., Gomes, P., Afonso, M., Shank, T., and Santos, R.S. (2010). High-throughput sequencing and analysis of the gill tissue transcriptome from the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *BMC Genomics* *11*, 559.
- Bettencourt, R., Rodrigues, M., Barros, I., Cerqueira, T., Freitas, C., Costa, V., Pinheiro, M., Egas, C., and Santos, R.S. (2014). Site-related differences in gene expression and bacterial densities in the mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Menez Gwen and Lucky Strike deep-sea hydrothermal vent sites. *Fish Shellfish Immunol.* *39*, 343–353.
- Boetius, a., and Felbeck, H. (1995). Digestive enzymes in marine invertebrates from hydrothermal vents and other reducing environments. *Mar. Biol.* *122*, 105–113.
- Bommer, U.A., and Thiele, B.J. (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 379–385.
- Boutet, I., Ripp, R., Lecompte, O., Dossat, C., Corre, E., Tanguy, A., and Lallier, F.H. (2011). Conjugating effects of symbionts and environmental factors on gene expression in deep-sea hydrothermal vent mussels. *BMC Genomics* *12*, 530.
- Bright, M., and Bulgheresi, S. (2010). A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* *8*, 218–230.
- Bright, M., Keckeis, H., and Fisher, C.R. (2000). An autoradiographic examination of carbon fixation, transfer and utilization in the *Riftia pachyptila* symbiosis. *Mar. Biol.* *136*, 621–632.
- Broderick, N. a (2015). A common origin for immunity and digestion. *Front. Immunol.* *6*, 1–3.
- Brownlie, J.C., and Johnson, K.N. (2009). Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol.* *17*, 348–354.
- Brune, B., von Knethen, a, and Sandau, K.B. (1999). Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ* *6*, 969–975.

- De Busserolles, F., Sarrazin, J., Gauthier, O., Gélinas, Y., Fabri, M.-C., Sarradin, P.-M., and Desbruyères, D. (2009). Are spatial variations in the diets of hydrothermal fauna linked to local environmental conditions? *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* *56*, 1649–1664.
- Callewaert, L., and Michiels, C.W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *J. Biosci.* *35*, 127–160.
- Campbell, M.G., and Karbstein, K. (2011). Protein-Protein Interactions within Late Pre-40S Ribosomes. *PLoS One* *6*, e16194.
- Canesi, L., Gallo, G., Gavioli, M., and Pruzzo, C. (2002). Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microsc. Res. Tech.* *57*, 469–476.
- Canton, J., Neculai, D., and Grinstein, S. (2013). Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 621–634.
- Carmen, J.C., and Sinai, A.P. (2007). Suicide prevention: Disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. *Mol. Microbiol.* *64*, 904–916.
- Caro, A., Got, P., Bouvy, M., Troussellier, M., and Gros, O. (2009). Effects of long-term starvation on a host bivalve (*Codakia orbicularis*, Lucinidae) and its symbiont population. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 3304–3313.
- Cary, S.C., and Giovannoni, S.J. (1993). Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 5695–5699.
- Cary, S.C., Cottrell, M.T., Stein, J.L., Camacho, F., and Desbruye, D. (1997). Molecular Identification and Localization of Filamentous Symbiotic Bacteria Associated with the Hydrothermal Vent Annelid *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 1124–1130.
- Cary, S.C., Shank, T., and Stein, J. (1998). Worms bask in extreme temperatures. *Nature* *391*.
- Catal  , M., Gasulla, F., Pradas del Real, A.E., García-Breijo, F., Reig-Armi  ana, J., and Barreno, E. (2010). Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. *BMC Microbiol.* *10*, 297.
- Cavanaugh, C.M. (1983). Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. *Nature* *302*, 58–61.
- Cavanaugh, C.M., Levering, P.R., Maki, J.S., Mitchell, R., and Lidstrom, M.E. (1987). Symbiosis of methylotrophic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* *325*, 346–348.
- Cavanaugh, C.M., Wirsén, C.O., and Jannasch, H.W. (1992). Evidence for Methylotrophic Symbionts in a Hydrothermal Vent Mussel (*Bivalvia: Mytilidae*) from the Mid-Atlantic Ridge. *Appl. Environ. Microbiol.* *58*, 3799–3803.
- Cavanaugh, C.M., McKiness, Z.O.E.P., Newton, I.L.G., and Stewart, F.J. (2006). *The Prokaryotes* (New York, NY: Springer New York).
- Charlou, J.L., Donval, J.P., Douville, E., Jean-baptiste, P., and Radford-knoery, J. (2000). Compared geochemical signatures and the evolution of Menez Gwen    37    50 X N / and Lucky Strike    37    17 X N / hydrothermal fluids , south of the Azores Triple Junction on the Mid-Atlantic Ridge.

- Chen, M.-C., Hong, M.-C., Huang, Y.-S., Liu, M.-C., Cheng, Y.-M., and Fang, L.-S. (2005). ApRab11, a cnidarian homologue of the recycling regulatory protein Rab11, is involved in the establishment and maintenance of the Aiptasia-Symbiodinium endosymbiosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1607–1616.
- Chen, X., Li, S., and Aksoy, S. (1999). Concordant Evolution of a Symbiont with Its Host Insect Species: Molecular Phylogeny of Genus *Glossina* and Its Bacteriome-Associated Endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *J. Mol. Evol.* 48, 49–58.
- Cheng, T.C. (1983). The Role of Lysosomes in Molluscan Inflammation. *Am. Soc. Zool.* 23, 129–144.
- Chevaldonné, P., Jollivet, D., Vangriesheim, A., and Desbruyère, D. (1997). in the eastern alvinellid polychaete dispersal of vent site distribution, bottom currents, and biological patterns. *Limnol Ocean.* 42, 67–80.
- Childress, J., Fisher, C.R., Brooks, J.M., Kennicutt II, M.C., Bidigare, R., and Anderson, A.. (1986). A Methanotrophic Marine Molluscan ( *Bivalvia*, *Mytilidae* ) Symbiosis : Mussels Fueled by Gas. *Science* (80-. ). 233, 1306–1308.
- Chipman, D.M., Sharon, N., Narten, A.H., Danford, M.D., and Chapman, D.M. (1969). Mechanism of Lysozyme Action Lysozyme is the first enzyme for which the relation between structure and function has become clear. *Science* (80-. ). 165, 454–465.
- Chipuk, J.E., and Green, D.R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 13, 994–1002.
- Choe, A.K., Werner, T., Stöven, S., Hultmark, D., and Kathryn, V. (2002). requirement for a Peptidoglycan recognition Protein (PGRP) in Relish Activation and Antibacterial Immune Responses in *Drosophila*. *Science* (80-. ). 296, 359–362.
- Chu, F.-L.E., and La Peyre, J.F. (1989). Effect of environmental factors and parasitism on hemolymph lysozyme and protein of American oysters (*Crassostrea virginica*). *J. Invertebr. Pathol.* 54, 224–232.
- Chu, H., and Mazmanian, S.K. (2013). Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. *Nat. Immunol.* 14, 668–675.
- Colaco, A., Colaço, A., Desbruyères, D., Comtet, T., and Alayse, A. (1998). Ecology of the Menez Gwen hydrothermal vent field ( Mid-Atlantic Ridge / Azores Triple Junction ). *Cah. Biol. Mar.* 39, 237–240.
- Colaço, a., Dehairs, F., and Desbruyères, D. (2002). Nutritional relations of deep-sea hydrothermal fields at the Mid-Atlantic Ridge: a stable isotope approach. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 49, 395–412.
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J., and Udvardi, M.K. (2004). Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 39, 487–512.
- Collins, A.J., Schleicher, T.R., Rader, B. a, and Nyholm, S. V (2012). Understanding the role of host hemocytes in a squid/vibrio symbiosis using transcriptomics and proteomics. *Front. Immunol.* 3, 91.

- Cong, L., Yang, X., Wang, X., Tada, M., Lu, M., Liu, H., and Zhu, B. (2009). Characterization of an i-type lysozyme gene from the sea cucumber *Stichopus japonicus*, and enzymatic and nonenzymatic antimicrobial activities of its recombinant protein. *J. Biosci. Bioeng.* 107, 583–588.
- Corliss, J.B., Dymond, J., Gordon, L.I., Edmond, J.M., von Herzen, R.P., Ballard, R.D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, a, Crane, K., et al. (1979). Submarine thermal springs on the galapagos rift. *Science* 203, 1073–1083.
- Von Cosel, R., and Olu, K. (2009). Large Vesicomidae (Mollusca: Bivalvia) from cold seeps in the Gulf of Guinea off the coasts of Gabon, Congo and northern Angola. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 56, 2350–2379.
- Von Cosel, R., Comtet, T., and Krylova, E. (1999). *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae) from Hydrothermal Vents on the Azores Triple Junction and the Logatchev Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge. *VELIGER*, 1999 218–248.
- Cox, D., Lee, D.J., Dale, B.M., Calafat, J., Greenberg, S., and Leet, D.J. (2000). Rab11-containing rapidly that promotes recycling compartment in macrophages phagocytosis. *PNAS* 97, 680–685.
- Creutz, C.E., Tomsig, J.L., Snyder, S.L., Gautier, M.-C., Skouri, F., Beisson, J., and Cohen, J. (1998). The Copines, a Novel Class of C2 Domain-containing, Calciumdependent, Phospholipid-binding Proteins Conserved from Paramecium to Humans. *J. Biol. Chem.* 273, 1393–1402.
- Dale, C., Plague, G.R., Wang, B., Ochman, H., and Moran, N.A. (2002). Type III secretion systems and the evolution of mutualistic endosymbiosis. *PN* 99, 12397–12402.
- Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell Death : Critical Control Points Review. 116, 205–219.
- Dechaine, E.G., and Cavanaugh, C.M. (2005). Symbioses of Methanotrophs and Deep-Sea Mussels ( Mytilidae : Bathymodiolinae ).
- Desbruyères, D., Chevaldonné, P., Alayse, A.-M., Jollivet, D., Lallier, F.H., Jouin-Toulmond, C., Zal, F., Sarradin, P.-M., Cosson, R.P., Caprais, J.-C., et al. (1998). Biology and ecology of the “Pompeii worm” (*alvinella pompejana* desbruyeres and laubier), a normal dweller of an extreme deep-sea environment: A synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 45, 383–422.
- Desbruyères, D., Biscoito, M., Caprais, J., Colac, A., Comtet, T., Crassous, P., Fouquet, Y., Khrpouno, A., Bris, N. Le, Olu, K., et al. (2001). Variations in deep-sea hydrothermal vent communities on the Mid-Atlantic Ridge near the Azores plateau. *Deep. Research Part I* 48, 1325–1346.
- Desjardins, M., Nzala, N.N., Corsini, R., and Rondeau, C. (1997). Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J. Cell Sci.* 110, 2303–2314.
- Ding, J., Li, J., Bao, Y., Li, L., Wu, F., and Zhang, G. (2011). Molecular characterization of a mollusk chicken-type lysozyme gene from *Haliotis discus hannai* Ino, and the antimicrobial activity of its recombinant protein. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 163–172.
- Distel, D., Baco, A., Chuang, E., Morrill, W., Cavanaugh, C., and Smith, C.. (2000). Do mussels take wooden steps to deep-sea vents? *Nature* 403, 725–726.

- Distel, D.L., Delong, E.F., and Waterbury, J.B. (1991). Phylogenetic Characterization and In Situ Localization of the Bacterial Symbiont of Shipworms ( Teredinidae : Bivalvia ) by Using 16S rRNA Sequence Analysis and Oligodeoxynucleotide Probe Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2376–2382.
- Distel, D.L., Lee, H.K., and Cavanaugh, C.M. (1995). Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA* 92, 9598–9602.
- Distel, D.L., Morrill, W., Maclaren-toussaint, N., Franks, D., and Waterbury, J. (2002). *Teredinibacter turnerae* gen . nov ., sp . nov ., a dinitrogen-fixing , cellulolytic , endosymbiotic  $\gamma$  -proteobacterium isolated from the gills of wood-boring molluscs ( Bivalvia : Teredinidae ). 2261–2269.
- Douglas, A.E. (1998). INSECT-MICROBIAL SYMBIOSES : Aphids and Their Symbiotic Bacteria Buchnera. *Annu.Rev.Entomol.* 43, 17–37.
- Van dover, C.L., and Fry, B. (1994). Microorganisms as food resources at deep-sea hydrothermal vents. *Limnol Ocean.* 39, 51–57.
- Van Dover, C.L., German, C.R., Speer, K., Parson, L.M., and Vrijenhoek, R.C. (2002). Evolution and Biogeography of Deep-Sea Vent and Seep Invertebrates. *Science* (80-. ). 295, 1253–1257.
- Dreon, M.S., Frassa, M.V., Ceolín, M., Ituarte, S., Qiu, J.-W., Sun, J., Fernández, P.E., and Heras, H. (2013). Novel animal defenses against predation: a snail egg neurotoxin combining lectin and pore-forming chains that resembles plant defense and bacteria attack toxins. *PLoS One* 8, e63782.
- Dubilier, N., Bergin, C., and Lott, C. (2008). Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 725–740.
- Dufour, S.C. (2005). Gill Anatomy and the Evolution of Symbiosis in the Bivalve Family Thyasiridae. *Biol. Bull.* 208, 200–212.
- Dunning, J.C., Clark, M.E., Oliveira, D.C.S.G., Jeremy, M., Fischer, P., Torres, M.C.M., Giebel, J.D., Kumar, N., Wang, S., Ingram, J., et al. (2007). Widespread Lateral Gene Transfer from Intracellular Bacteria to Multicellular Eukaryotes. *Science* (80-. ). 317, 1753–1755.
- Duperron, S., Bergin, C., Zielinski, F., Blazejak, a, Pernthaler, a, McKiness, Z.P., DeChaine, E., Cavanaugh, C.M., and Dubilier, N. (2006). A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia : Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environ. Microbiol.* 8, 1441–1447.
- Duperron, S., Lorion, J., Samadi, S., Gros, O., and Gaill, F. (2009). Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: diversity, function and evolution. *C. R. Biol.* 332, 298–310.
- Duperron, S., Pottier, M.-A., Léger, N., Gaudron, S.M., Puillandre, N., Le Prieur, S., Sigwart, J.D., Ravaux, J., and Zbinden, M. (2013). A tale of two chitons: is habitat specialisation linked to distinct associated bacterial communities? *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 552–567.
- Dziarski, R., Dziarski, R., Gupta, D., and Gupta, D. (2006). The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.* 7, 232.

- Eckelbarger, K.J., and Young, C.M. (1999). Ultrastructure of gametogenesis in a chemosynthetic mytilid bivalve ( *Bathymodiolus childressi* ) from a bathyal, methane seep environment (northern Gulf of Mexico). *Mar. Biol.* *135*, 635–646.
- Elisabeth, N.H., Gustave, S.D.D., and Gros, O. (2012). Cell proliferation and apoptosis in gill filaments of the lucinid *Codakia orbiculata* (Montagu, 1808) (Mollusca: Bivalvia) during bacterial decolonization and recolonization. *Microsc. Res. Tech.* *75*, 1136–1146.
- Elrod-Erickson, M., Mishra, S., and Schneider, D. (2000). Interactions between the cellular and humoral immune responses in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *10*, 781–784.
- Estévez-Calvar, N., Romero, A., Figueras, A., and Novoa, B. (2013). Genes of the mitochondrial apoptotic pathway in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* *8*, e61502.
- Evans, C.J., Hartenstein, V., and Banerjee, U. (2003). Thicker Than Blood : Conserved Mechanisms in *Drosophila* and Vertebrate Hematopoiesis. *5*, 673–690.
- Farcy, E., Fleury, C., Lelong, C., Dubos, M.P., Voiseux, C., Fiévet, B., and Lebel, J.M. (2008). Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Mar. Environ. ...* *66*, 300–308.
- Fares, M., Ruiz-Gonzalez, M.X., Moya, A., Elena, S.F., and Barrio, E. (2002). GroEL buffers against deleterious mutations. *Nature* *417*, 398.
- Feig, C., and Peter, M.E. (2007). How apoptosis got the immune system in shape. *Eur. J. Immunol.* *37 Suppl 1*, S61–S70.
- Felbeck, H., and Somero, G.N. (1982). Primary production in deep-sea hydrothermal vent organisms: roles of sulfide-oxidizing bacteria. *TIBS* 201–204.
- Fiala-Medioni, A., Michalski, J., Jollès, J., Alonso, C., and Montreuil, J. (1994). Lysosomal and lysozyme activities in the gill of bivalves from deep hydrothermal vents. *C.R. Acad. Sci. Sci. La vie/Life Sci.* *317*: 239–244.
- Fiala-Médioni, A., McKiness, Z.P., Dando, P., Boulegue, J., Mariotti, A., Alayse-Danet, A.M., Robinson, J., and Cavanaugh, C. (2002). Ultrastructural, biochemical, and immunological characterization of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid-Atlantic Ridge: evidence for a dual symbiosis. *Mar. Biol.* *141*, 1035–1043.
- Fisher, C., Childress, J., Oremland, R., and Bidigare, R. (1987). The importance of methane and thiosulfate in the metabolism of the bacterial symbionts of two deep-sea mussels. *Mar. Biol.* *71*, 59–71.
- Fisher, C.R., Brooks, J.M., Vodenichar, J.S., Zande, J.M., Childress, J.J., and Jr., R. a. B. (1993). The Co-occurrence of Methanotrophic and Chemoautotrophic Sulfur-Oxidizing Bacterial Symbionts in a Deep-sea Mussel. *Mar. Ecol.* *14*, 277–289.
- Forstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* *33*, 829–837.
- Foster, J.S., Apicella, M. a, and McFall-Ngai, M.J. (2000). *Vibrio fischeri* lipopolysaccharide induces developmental apoptosis, but not complete morphogenesis, of the *Euprymna scolopes* symbiotic light organ. *Dev. Biol.* *226*, 242–254.



- Franzenburg, S., Fraune, S., Künzel, S., Baines, J.F., Domazet-Lošo, T., and Bosch, T.C.G. (2012). MyD88-deficient Hydra reveal an ancient function of TLR signaling in sensing bacterial colonizers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 19374–19379.
- Friedrich, C.G., Rother, D., Bardischewsky, F., and Quentmeier, A. (2001). Oxidation of Reduced Inorganic Sulfur Compounds by Bacteria : Emergence of a Common Mechanism ? *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 2873–2882.
- Fu, H., Subramanian, R.R., and Masters, S.C. (2000). 14-3-3 P PROTEINS : Structure , Function , and Regulation.
- Fujiwara, Y., Takai, K., Uematsu, K., Tsuchida, S., Hunt, J., and Hashimoto, J. (2000). Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: influence on host distributions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *208*, 147–155.
- Fujiwara, Y., Kato, C., Masui, N., Fujikura, K., and Kojima, S. (2001). Dual symbiosis in the cold-seep thyasirid clam *Maorithyas hadalis* from the hadal zone in the Japan Trench, western Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *214*, 151–159.
- Fukatsu, T., and Ishikawa, H. (1998). Differential immunohistochemical secondary Intracellular Symbiotic Bacteria. *Appl. Entomol. Zool.* *33*, 321–326.
- Gelius, E., Persson, C., Karlsson, J., and Steiner, H. (2003). A mammalian peptidoglycan recognition protein with N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *306*, 988–994.
- Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C., Kopczynski, C., Duyk, G., Reichhart, J.-M., and Hoffmann, J. a. (2001). Drosophila Immune Deficiency (IMD) Is a Death Domain Protein that Activates Antibacterial Defense and Can Promote Apoptosis. *Dev. Cell* *1*, 503–514.
- Gerdol, M., and Venier, P. (2015). An updated molecular basis for mussel immunity. *Fish Shellfish Immunol.*
- Gestal, C., Pallavicini, A., Venier, P., Novoa, B., and Figueras, A. (2010). MgC1q, a novel C1q-domain-containing protein involved in the immune response of *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* *34*, 926–934.
- Goedken, M., Morsey, B., Sunila, I., Dungan, C., and De Guise, S. (2005). The effects of temperature and salinity on apoptosis of *Crassostrea virginica* hemocytes and *Perkinsus marinus*. *J. Shellfish Res.* *24*, 177–183.
- Goodson, M.S., Kojadinovic, M., Troll, J. V, Scheetz, T.E., Casavant, T.L., Soares, M.B., and Mcfall-ngai, M.J. (2005). Identifying Components of the NF- $\kappa$ B Pathway in the Beneficial *Euprymna scolopes* - *Vibrio fischeri* Light Organ Symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 6934–6946.
- Goodson, M.S., Crookes-Goodson, W.J., Kimbell, J.R., and McFall-Ngai, M.J. (2006). Characterization and role of p53 family members in the symbiont-induced light organ. *Biol. Bull.* *211*, 7–17.
- Goto, A., and Kurata, S. (2006). The multiple functions of the PGRP family in *Drosophila* immunity Abstract The innate immune system discriminates between infectious non-self and self using germ-

line- encoded pattern recognition receptors ( PRRs ) that are highly conserved from insects to. 103–110.

Goto, T., Abe, Y., Kakuta, Y., Takeshita, K., Imoto, T., and Ueda, T. (2007). Crystal Structure of Tapes japonica Lysozyme with Substrate Analogue: *J. Biol. Chem.* 282, 27459–27467.

Gross, R., Vavre, F., Heddi, A., Hurst, G.D.D., Zchori-Fein, E., and Bourtzis, K. (2009). Immunity and symbiosis. *Mol. Microbiol.* 73, 751–759.

Guan, R., and Mariuzza, R. a. (2007). Peptidoglycan recognition proteins of the innate immune system. *Trends Microbiol.* 15, 127–134.

Guezi, H., Boutet, I., Andersen, A., Lallier, F., and Tanguy, A. (2014). Comparative analysis of symbiont ratios and gene expression in natural populations of two Bathymodiolus mussel species. *Symbiosis* 63, 19–29.

Gunji, K., Ishizaki, S., and Shiomi, K. (2010). Cloning of complementary and genomic DNAs encoding echotoxins, proteinaceous toxins from the salivary gland of marine gastropod Monoplex echo. *Protein J.* 29, 487–492.

Gunning, P., O’neill, G., and Hardeman, E. (2008). Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol. Rev.* 1–35.

Guppy, M., Fuery, C.J., and Flanigan, J.E. (1994). Biochemical principles of metabolic depression. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 109, 175–189.

Haddad, A., Camacho, F., Durand, P., and Cary, S.C. (1995). Phylogenetic Characterization of the Epibiotic Bacteria Associated with the Hydrothermal Vent Polychaete Alvinella pompejana  
Downloaded from <http://aem.asm.org/> on September 21 , 2015 by STATION BIOLOGIQUE EURO I-334. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1679–1687.

Hagger, J. a., Depledge, M.H., and Galloway, T.S. (2005). Toxicity of tributyltin in the marine mollusc Mytilus edulis. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 811–816.

Halanych, K.M., and Kocot, K.M. (2014). Repurposed Transcriptomic Data Facilitate Discovery of Innate Immunity Toll-Like Receptor ( TLR ) Genes. *Biol. Bull.* 227, 201–209.

Halary, S., Riou, V., Gaill, F., Boudier, T., and Duperron, S. (2008). 3D FISH for the quantification of methane- and sulphur-oxidizing endosymbionts in bacteriocytes of the hydrothermal vent mussel Bathymodiolus azoricus. *ISME J.* 2, 284–292.

Hancock, R.E.W., Brown, K.L., and Mookherjee, N. (2006). Host defence peptides from invertebrates – emerging antimicrobial strategies. *Immunobiology* 211, 315–322.

Hand, S.C., and Hardewig, I. (1996). Downregulation of cellular metabolism during environmental stress: mechanisms and implications. *Annu. Rev. Physiol.* 58, 539–563.

Hanson, R.S., and Hanson, T.E. (1996). Methanotrophic Bacteria. *Microbiol. Rev.* 60, 439–471.

Harvill, E.T. (2013). Cultivating Our “Frienemies”: Viewing Immunity as Microbiome Management. *MBio* 4, 3–5.

- Hashimoto, C., Hudson, K.L., and Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269–279.
- Hattan, S.J., Laue, T.M., and Chasteen, N.D. (2001). Purification and characterization of a novel calcium-binding protein from the extrapallial fluid of the mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* 276, 4461–4468.
- Hawkins, T.D., Bradley, B.J., and Davy, S.K. (2013). Nitric oxide mediates coral bleaching through an apoptotic-like cell death pathway: evidence from a model sea anemone-dinoflagellate symbiosis. *FASEB J.* 27, 4790–4798.
- He, C., Yu, H., Liu, W., Su, H., Shan, Z., Bao, X., Li, Y., Fu, L., and Gao, X. (2012). A goose-type lysozyme gene in Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*): cDNA cloning, mRNA expression and promoter sequence analysis. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 162, 34–43.
- Heddi, A., Charles, H., Khatchadourian, C., Bonnot, G., and Nardon, P. (1998). Molecular Characterization of the Principal Symbiotic Bacteria of the Weevil *Sitophilus oryzae*: A Peculiar G + C Content of an Endocytobiotic DNA. *J. Mol. Evol.* 47, 52–61.
- Hegde, P.S., White, I.R., and Debouck, C. (2003). Interplay of transcriptomics and proteomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 647–651.
- Hepler, J.R., and Gilman, a G. (1992). G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17, 383–387.
- Hérouart, D., Baudouin, E., Frendo, P., Harrison, J., Santos, R., Jamet, A., Van de Sype, G., Touati, D., and Puppo, A. (2002). Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume–Rhizobium symbiosis? *Plant Physiol. Biochem.* 40, 619–624.
- Hershberg, R., and Petrov, D. a (2010). Evidence that mutation is universally biased towards AT in bacteria. *PLoS Genet.* 6, e1001115.
- Hessler, R.R., and Sanders, H.L. (1967). Faunal diversity in the deep-sea. *Deep. Res.* 14, 65–78.
- Hilário, A., Capa, M., Dahlgren, T.G., Halanych, K.M., Little, C.T.S., Thornhill, D.J., Verna, C., and Glover, A.G. (2011). New perspectives on the ecology and evolution of siboglinid tubeworms. *PLoS One* 6, e16309.
- Hildebrand, F., Meyer, A., and Eyre-Walker, A. (2010). Evidence of selection upon genomic GC-content in bacteria. *PLoS Genet.* 6, e1001107.
- Hoffmann, J. a, and Reichhart, J.-M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat. Immunol.* 3, 121–126.
- Hoffmann, J. a, Reichhart, J.-M., and Hetru, C. (1996). Innate immunity in higher insects. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 8–13.
- Hooper, C., Day, R., Slocombe, R., Handler, J., and Benkendorff, K. (2007). Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 363–379.
- Hornig, T., Barton, G.M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP : an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2, 835–841.

- Hubert, F., Noel, T., and Roch, P. (1996). A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) [published erratum appears in Eur J Biochem 1996 Sep 15;240(3):815]. *Eur. J. Biochem.* 240, 302–306.
- Hückelhoven, R. (2004). BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 9, 299–307.
- Hussa, E. a, O'Shea, T.M., Darnell, C.L., Ruby, E.G., and Visick, K.L. (2007). Two-component response regulators of *Vibrio fischeri*: identification, mutagenesis, and characterization. *J. Bacteriol.* 189, 5825–5838.
- Indrasumunar, A., Wilde, J., Hayashi, S., Li, D., and Gresshoff, P.M. (2015). Functional analysis of duplicated Symbiosis Receptor Kinase (SymRK) genes during nodulation and mycorrhizal infection in soybean (*Glycine max*). *J. Plant Physiol.* 176, 157–168.
- Ip, Y.T., Reach, M., Engstrom, Y., Gonzalez-crespo, S., and Tatei, K. (1993). Dif , a dorsal-Related Gene That Mediates an Immune Response in *Drosophila*. *Cell* 75, 753–763.
- Itoh, N., and Takahashi, K.G. (2007). cDNA cloning and in situ hybridization of a novel lysozyme in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 148, 160–166.
- Itoh, N., and Takahashi, K.G. (2008). Distribution of multiple peptidoglycan recognition proteins in the tissues of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 150, 409–417.
- Itoh, N., Xue, Q., Li, Y., Cooper, R.K., and La Peyre, J.F. (2007). cDNA cloning and tissue expression of plasma lysozyme in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish Shellfish Immunol.* 23, 957–968.
- Jensen, F.B. (2001). Comparative analysis of autoxidation of haemoglobin. *J. Exp. Biol.* 204, 2029–2033.
- Jessen-Eller, K., Kreiling, J. a, Begley, G.S., Steele, M.E., Walker, C.W., Stephens, R.E., and Reinisch, C.L. (2002). A new invertebrate member of the p53 gene family is developmentally expressed and responds to polychlorinated biphenyls. *Environ. Health Perspect.* 110, 377–385.
- Jolles, J., Jolles, P., Bowman, B.H., Prager, E.M., Stewart, C.B., and Wilson, a C. (1989). Episodic evolution in the stomach lysozymes of ruminants. *J Mol Evol* 28, 528–535.
- Jolles, J., Fiala-medioni, A., and Jolles, P. (1996). The Ruminant Digestion Model Using Bacteria Already Employed Early in Evolution by Symbiotic Molluscs. *J. Mol. Evol.* 523–527.
- Kacser, H., and Porteous, J.W. (1987). Control of metabolism: What do we have to measure? *Trends Biochem. Sci.* 12, 5–14.
- Kádár, E., Bettencourt, R., Costa, V., Santos, R.S., Lobo-da-Cunha, A., and Dando, P. (2005). Experimentally induced endosymbiont loss and re-acquirement in the hydrothermal vent bivalve *Bathymodiolus azoricus*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 318, 99–110.
- Kaneko, T., Yano, T., Aggarwal, K., Lim, J.-H., Ueda, K., Oshima, Y., Peach, C., Erturk-Hasdemir, D., Goldman, W.E., Oh, B.-H., et al. (2006). PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat. Immunol.* 7, 715–723.

- Kefaloyianni, E. (2005). Acute thermal stress and various heavy metals induce tissue-specific pro- or anti-apoptotic events via the p38-MAPK signal transduction pathway in *Mytilus galloprovincialis* (Lam.). *J. Exp. Biol.* *208*, 4427–4436.
- Kelley, M.L., Winge, P., Heaney, J.D., Stephens, R.E., Farrell, J.H., Van Beneden, R.J., Reinisch, C.L., Lesser, M.P., and Walker, C.W. (2001). Expression of homologues for p53 and p73 in the softshell clam (*Mya arenaria*), a naturally-occurring model for human cancer. *Oncogene* *20*, 748–758.
- Kidd, S. (1992). Characterization of the *Drosophila* cactus locus and analysis of interactions between cactus and dorsal proteins. *Cell* *71*, 623–635.
- Kiers, E.T., Rousseau, R.A., West, S.A., and Denison, R.F. (2003). Host sanctions and the legume – rhizobium mutualism. *Nature* *425*, 1095–1098.
- Kikuchi, Y., Hosokawa, T., Nikoh, N., Meng, X.-Y., Kamagata, Y., and Fukatsu, T. (2009). Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. *BMC Biol.* *7*, 2.
- Kim, J., Adhya, M., Cho, S., Choi, K., and Cho, M. (2008). Characterization, tissue expression, and immunohistochemical localization of MCL3, a C-type lectin produced by *Perkinsus olseni*-infected Manila clams (*Ruditapes philippinarum*). *Fish Shellfish Immunol.* *25*, 598–603.
- Kim, J.K., Han, S.H., Kim, C.-H., Jo, Y.H., Futahashi, R., Kikuchi, Y., Fukatsu, T., and Lee, B.L. (2014). Molting-associated suppression of symbiont population and up-regulation of antimicrobial activity in the midgut symbiotic organ of the *Riptortus*-*Burkholderia* symbiosis. *Dev. Comp. Immunol.* *43*, 10–14.
- Kim, M.-S., Byun, M., and Oh, B.-H. (2003). Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nat. Immunol.* *4*, 787–793.
- Kiss, T. (2010). Apoptosis and its functional significance in molluscs. *Apoptosis* *15*, 313–321.
- Kisseleva, E.P. (2014). Innate immunity underlies symbiotic relationships. *Biochem. Biokhimiia* *79*, 1273–1285.
- Kleiner, M., Petersen, J.M., and Dubilier, N. (2012a). Convergent and divergent evolution of metabolism in sulfur-oxidizing symbionts and the role of horizontal gene transfer. *Curr. Opin. Microbiol.* *15*, 621–631.
- Kleiner, M., Wentrup, C., Lott, C., Teeling, H., Wetzel, S., Young, J., Chang, Y.-J., Shah, M., VerBerkmoes, N.C., Zarzycki, J., et al. (2012b). Metaproteomics of a gutless marine worm and its symbiotic microbial community reveal unusual pathways for carbon and energy use. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E1173–E1182.
- König, S., Le Guyader, H., and Gros, O. (2015). Thioautotrophic bacterial endosymbionts are degraded by enzymatic digestion during starvation: Case study of two lucinids *Codakia orbicularis* and *C. orbiculata*. *Microsc. Res. Tech.* *78*, 173–179.
- Koonin, E. V. (2015). Archaeal ancestors of eukaryotes: not so elusive any more. *BMC Biol.* *13*, 84.
- Kovalchuk, S.N., Chikalovets, I. V, Chernikov, O. V, Molchanova, V.I., Li, W., Rasskazov, V. a, and Lukyanov, P. a (2013). cDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel

*Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1320–1324.

Krämer, M., and Cypionka, H. (1989). Sulfate formation via ATP sulfurylase in thiosulfate- and sulfite-disproportionating bacteria. *Arch. Microbiology* 151, 232–237.

Krueger, D.M Dubilier, N Cavanaugh, C.. (1996). Chemoautotrophic symbiosis in the tropical clam *Solemya occidentalis* ( Bivalvia : Protobranchia ): ultrastructural and phylogenetic analysis. *Mar. Biol.* 126, 55–64.

Kuwahara, H., Yoshida, T., Takaki, Y., Shimamura, S., Nishi, S., Harada, M., Matsuyama, K., Takishita, K., Kawato, M., Uematsu, K., et al. (2007). Reduced genome of the thioautotrophic intracellular symbiont in a deep-sea clam, *Calyptogena okutanii*. *Curr. Biol.* 17, 881–886.

Kuwano, Y., Yoneda, K., Kawaguchi, Y., Araki, N., and Araki, T. (2013). The Complete Amino Acid Sequence and Enzymatic Properties of an i-Type Lysozyme Isolated from the Common Orient Clam ( *Meretrix lusoria* ). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 2269–2277.

Kvennefors, E.C.E., Leggat, W., Hoegh-Guldberg, O., Degnan, B.M., and Barnes, A.C. (2008). An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1582–1592.

Kyuno, A., Shintaku, M., Fujita, Y., Matsumoto, H., Utsumi, M., Watanabe, H., Fujiwara, Y., and Miyazaki, J.-I. (2009). Dispersal and Differentiation of Deep-Sea Mussels of the Genus *Bathymodiolus* (Mytilidae, Bathymodiolinae). *J. Mar. Biol.* 2009, 1–15.

Lange, C., Hemmrich, G., Klostermeier, U.C., Lo, J.A., Miller, D.J., Rahn, T., Weiss, Y., Bosch, T.C.G., and Rosenstiel, P. (2011). Defining the Origins of the NOD-Like Receptor System at the Base of Animal Evolution. *Mol. Biol. Evol.* 28, 1687–1702.

Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., and Meister, M. (2001). Postembryonic Hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 230, 243–257.

Lee, J., Richburg, J.H., Shipp, E.B., Meistrich, M.L., and Boekelheide, K.I.M. (1999). The Fas System , a Regulator of Testicular Germ Cell Apoptosis , Is Differentially Up-Regulated in Sertoli Cell Versus Germ Cell Injury of the Testis \*. *Endocrinology* 140, 852–858.

Lee, Y.K., Lee, J., and Lee, H.K. (2001). Microbial Symbiosis in Marine Sponges. 39, 254–264.

Lemaitre, B. (2004). FOCUS ON TLR SIGNALLING The road to Toll. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 521–527.

Lemaitre, B., Kromer-metzger, E., Michaut, L., Nicolas, E., Meister, M., Georgel, P., Reichhart, J., and Hoffmann, J.A. (1995). A recessive mutation , immune deficiency ( imd ), defines two distinct control pathways in the *Drosophila* host defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9465–9469.

Leser, T.D., and Mølbak, L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ. Microbiol.* 11, 2194–2206.

Letsou, A., Alexander, S., Orth, K.I.M., and Wasserman, S.A. (1991). Genetic and molecular characterization of tube , a *Drosophila* gene maternally required for embryonic dorsoventral polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 810–814.

- Leulier, F., Rodriguez, A., Khush, R.S., Abrams, J.M., and Lemaitre, B. (2000). The *Drosophila* caspase Dredd is required to resist Gram-negative bacterial infection. *EMBO Rep.* 1, 353–358.
- Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J.-H., Caroff, M., Lee, W.-J., Mengin-Lecreulx, D., and Lemaitre, B. (2003). The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat. Immunol.* 4, 478–484.
- Leulier, F., Lhocine, N., Lemaitre, B., and Meier, P. (2006). The *Drosophila* inhibitor of apoptosis protein DIAP2 functions in innate immunity and is essential to resist gram-negative bacterial infection. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7821–7831.
- Li, H., Parisi, M.-G., Toubiana, M., Cammarata, M., and Roch, P. (2008). Lysozyme gene expression and hemocyte behaviour in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, after injection of various bacteria or temperature stresses. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 143–152.
- Li, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Xiang, Z., Tong, Y., Qu, F., and Yu, Z. (2014). Genomic characterization and expression analysis of five novel IL-17 genes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 455–465.
- Li, L., Qiu, L., Song, L., Song, X., Zhao, J., Wang, L., Mu, C., and Zhang, H. (2009). First molluscan TNFR homologue in Zhikong scallop: molecular characterization and expression analysis. *Fish Shellfish Immunol.* 27, 625–632.
- Li, X., Wang, S., Qi, J., Echtenkamp, S.F., Chatterjee, R., Wang, M., Boons, G.J., Dziarski, R., and Gupta, D. (2007). Zebrafish Peptidoglycan Recognition Proteins Are Bactericidal Amidases Essential for Defense against Bacterial Infections. *Immunity* 27, 518–529.
- Lim, J.-H., Kim, M.-S., Kim, H.-E., Yano, T., Oshima, Y., Aggarwal, K., Goldman, W.E., Silverman, N., Kurata, S., and Oh, B.-H. (2006). Structural basis for preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins. *J. Biol. Chem.* 281, 8286–8295.
- Lind, P. a, and Andersson, D.I. (2008). Whole-genome mutational biases in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17878–17883.
- Lipsitch, M., Nowak, M.A., Ebert, D., May, R.M., and Nowak, A. (1995). and horizontally of vertically The population dynamics transmitted parasites. *Proc. R. Soc. Lond. B* 260, 321–327.
- Little, C.T.S., and Vrijenhoek, R.C. (2003). Are hydrothermal vent animals living fossils? *Trends Ecol. Evol.* 18, 582–588.
- Liu, H.-H., Xiang, L.-X., and Shao, J.-Z. (2014). A novel C1q-domain-containing (C1qDC) protein from *Mytilus coruscus* with the transcriptional analysis against marine pathogens and heavy metals. *Dev. Comp. Immunol.* 44, 70–75.
- Lockshin, R. a., and Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2405–2419.
- Login, F.H., and Heddi, A. (2013). Insect immune system maintains long-term resident bacteria through a local response. *J. Insect Physiol.* 59, 232–239.

- Login, F.H., Balmand, S., Vallier, A., Vincent-Monégat, C., Vigneron, A., Weiss-Gayet, M., Rochat, D., and Heddi, A. (2011). Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science* 334, 362–365.
- Loo, Y.-M., and Gale, M. (2011). Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 34, 680–692.
- Lorion, J., Buge, B., Cruaud, C., and Samadi, S. (2010). New insights into diversity and evolution of deep-sea Mytilidae (Mollusca: Bivalvia). *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 71–83.
- Lorion, J., Kiel, S., Faure, B., Kawato, M., Ho, S.Y.W., Marshall, B., Tsuchida, S., Miyazaki, J.-I., and Fujiwara, Y. (2013). Adaptive radiation of chemosymbiotic deep-sea mussels. *Proc. Biol. Sci.* 281, 20132972.
- Lushchak, V.I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30.
- Maier, T., Güell, M., and Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 583, 3966–3973.
- Malham, S.K., Lacoste, A., Gélébart, F., Cueff, A., and Poulet, S. a (2003). Evidence for a direct link between stress and immunity in the mollusc *Haliotis tuberculata*. *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.* 295, 136–144.
- Mallo, G. V., Kurz, C.L., Couillault, C., Pujol, N., Granjeaud, S., Kohara, Y., and Ewbank, J.J. (2002). Inducible Antibacterial Defense System in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 12, 1209–1214.
- Mansour, K. (1930). Preliminary " Studies on the Bacterial Cell- mass ( Accessory Cell-mass ) of *Calandra oryzae* ( Linn .): The Rice Weevil. *J. Microsc. Sci.*
- Martins, E., Figueras, A., Novoa, B., Santos, R.S., Moreira, R., and Bettencourt, R. (2014). Comparative study of immune responses in the deep-sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* and the shallow-water mussel *Mytilus galloprovincialis* challenged with *Vibrio* bacteria. *Fish Shellfish Immunol.* 40, 485–499.
- Matsumoto, T., Nakamura, A.M., and Takahashi, K.G. (2006). Cloning of cDNAs and hybridization analysis of lysozymes from two oyster species, *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 145, 325–330.
- McCord, J.M., Keele, B.B., and Fridovich, I. (1971). An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 1024–1027.
- McCutcheon, J.P., and Moran, N. a (2012). Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 13–26.
- McFall-ngai, M. (2007). Care for the community. *Nature* 445, 153.
- McFall-Ngai, M., Hadfield, M.G., Bosch, T.C.G., Carey, H. V, Domazet-Lošo, T., Douglas, A.E., Dubilier, N., Eberl, G., Fukami, T., Gilbert, S.F., et al. (2013). Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3229–3236.
- McHenery, J.G., and Birkbeck, T.H. (1985). Uptake and processing of cultured microorganisms by bivalves. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 90, 145–163.



- McHenery, J.G., Birkbeck, T.H., and Allen, J. a. (1979). The occurrence of lysozyme in marine bivalves. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 63, 25–28.
- McMullin, Erin R Schaeffer, S.W., and Fisher, C.R. (2003). Phylogeny and Biogeography of Deep Sea Vestimentiferan Tubeworms and Their Bacterial Symbionts. 34, 1–41.
- Meister, M., Lemaitre, B., and Hoffmann, J.A. (1997). Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *bioEssays* 19, 1019–1026.
- Meistertzheim, A.-L., Tanguy, A., Moraga, D., and Thébault, M.-T. (2007). Identification of differentially expressed genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to prolonged thermal stress. *FEBS J.* 274, 6392–6402.
- Mellroth, P., and Steiner, H. (2006). PGRP-SB1: An N-acetylmuramoyl l-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350, 994–999.
- Michel, T., Reichhart, J.M., Hoffmann, J. a, and Royet, J. (2001). *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 414, 756–759.
- Michelucci, A., Cordes, T., Ghelfi, J., Pailot, A., Reiling, N., Goldmann, O., Binz, T., Wegner, A., Tallam, A., Rausell, A., et al. (2013). Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7820–7825.
- Micić, M., Bihari, N., Jaksić, Z., Müller, W.E.G., and Batel, R. (2002). DNA damage and apoptosis in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 53, 243–262.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., and Roch, P. (2000). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Lett.* 486, 185–190.
- Miyazaki, J.-I., de Oliveira Martins, L., Fujita, Y., Matsumoto, H., and Fujiwara, Y. (2010). Evolutionary process of deep-sea bathymodiolus mussels. *PLoS One* 5, e10363.
- Moran, N. a., McCutcheon, J.P., and Nakabachi, A. (2008). Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annu. Rev. Genet.* 42, 165–190.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., and Latorre, A. (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat. Rev. Genet.* 9, 218–229.
- Nakabachi, A., Shigenobu, S., Sakazume, N., Shiraki, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P., Ishikawa, H., Kudo, T., and Fukatsu, T. (2005). Transcriptome analysis of the aphid bacteriocyte, the symbiotic host cell that harbors an endocellular mutualistic bacterium, *Buchnera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 5477–5482.
- Nakagawa, S., and Takai, K. (2008). Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 1–14.
- Natera, S.H., Guerreiro, N., and Djordjevic, M. a (2000). Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 13, 995–1009.
- Nelson, D.C., Hagen, K.D., and Edwards, D.B. (1995). The gill symbiont of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus* is a psychrophilic, chemoautotrophic, sulfur bacterium. *Mar. Biol.* 121, 487–495.

- Neulinger, S., Sahling, H., Söling, J., and Imhoff, J. (2006). Presence of two phylogenetically distinct groups in the deep-sea mussel *Acharax* (Mollusca: Bivalvia: Solemyidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 312, 161–168.
- Newton, A.I.L.G., Woyke, T., Auchtung, T.A., Dilly, G.F., Dutton, R.J., Fisher, M.C., Fontanez, M., Lau, E., Stewart, F.J., Richardson, P.M., et al. (2007). The *Calyptogena magnifica* Chemoautotrophic Symbiont Genome. *Science* (80-. ). 315, 998–1000.
- Ni, D., Song, L., Wu, L., Chang, Y., Yu, Y., Qiu, L., and Wang, L. (2007). Molecular cloning and mRNA expression of peptidoglycan recognition protein (PGRP) gene in bay scallop (*Argopecten irradians*, Lamarck 1819). *Dev. Comp. Immunol.* 31, 548–558.
- Nilsen, I.W., Myrnes, B., Edvardsen, R.B., and Chourrout, D. (2003). Urochordates carry multiple genes for goose-type lysozyme and no genes for chicken- or invertebrate-type lysozymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2210–2218.
- Nishikori, K., Morioka, K., Kubo, T., and Morioka, M. (2009). Age- and morph-dependent activation of the lysosomal system and Buchnera degradation in aphid endosymbiosis. *J. Insect Physiol.* 55, 351–357.
- Nussbaumer, A.D., Fisher, C.R., and Bright, M. (2006). Horizontal endosymbiont transmission in hydrothermal vent tubeworms. *Nature* 441, 345–348.
- Nyholm, S. V., and Graf, J. (2012). Knowing your friends: invertebrate innate immunity fosters beneficial bacterial symbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 815–827.
- Nyholm, S. V., and McFall-Ngai, M.J. (2004). The winnowing: establishing the squid-vibrio symbiosis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 632–642.
- Nyholm, S. V., Stabb, E. V., Ruby, E.G., and McFa (2000). Establishment of an animal-bacterial association : Recruiting symbiotic vibrios from the environment. *PNAS* 97, 10231–10235.
- Nyholm, S. V., Song, P., Dang, J., Bunce, C., and Girguis, P.R. (2012). Expression and putative function of innate immunity genes under in situ conditions in the symbiotic hydrothermal vent tubeworm *Ridgeia piscesae*. *PLoS One* 7, 1–12.
- O'Neill, L. a J. (2008). When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity* 29, 12–20.
- Okuwa, T., Katayama, T., Takano, a, Kodaira, K., and Yasukawa, H. (2001). Two cell-counting factors regulate the aggregate size of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Growth Differ.* 43, 735–744.
- Oliver, G., and Holmes, A.M. (2006). New species of Thyasiridae ( Bivalvia ) from chemosynthetic communities in the Atlantic Ocean . *J. Conchol.* 39, 175–184.
- Opferman, J.T., and Korsmeyer, S.J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat. Immunol.* 4, 410–415.
- Orcutt, B.N., Sylvan, J.B., Knab, N.J., and Edwards, K.J. (2011). Microbial Ecology of the Dark Ocean above, at, and below the Seafloor. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 361–422.

- Page, H.M., Fisher, C.R., and Childress, J.J. (1990). Role of filter-feeding in the nutritional biology of a deep-sea mussel with methanotrophic symbionts. *Mar. Biol.* 257, 251–257.
- Pan, B., Ren, Y., Gao, J., and Gao, H. (2015). De novo RNA-Seq Analysis of the Venus Clam, *Cyclina sinensis*, and the Identification of Immune-Related Genes. *PLoS One* 10, e0123296.
- Pannebakker, B. a, Loppin, B., Elemans, C.P.H., Humblot, L., and Vavre, F. (2007). Parasitic inhibition of cell death facilitates symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 213–215.
- Parisi, M.-G., Toubiana, M., Mangano, V., Parrinello, N., Cammarata, M., and Roch, P. (2012). MIF from mussel: coding sequence, phylogeny, polymorphism, 3D model and regulation of expression. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 688–696.
- Paskewitz, S.M., Li, B., and Kajla, M.K. (2008). Cloning and molecular characterization of two invertebrate-type lysozymes from *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 17, 217–225.
- Le Pennec, M., Beninger, P.G., and Herry, A. (1995). Feeding and digestive adaptations of bivalve mollusc to sulphide-rich habitats. *Comp. Biochem. Physiol.* 111A, 183–189.
- Le Pennec, M Donval, A Herry, A. (1990). Nutritional strategies of the hydrothermal ecosystem bivalves. *Prog. Ocean.* 24, 71–80.
- Perestenko, P. V, Pooler, A.M., Noorbakhshnia, M., Gray, A., Bauccio, C., and Jeffrey McIlhinney, R.A. (2010). Copines-1, -2, -3, -6 and -7 show different calcium-dependent intracellular membrane translocation and targeting. *FEBS J.* 277, 5174–5189.
- Petersen, J.M., Zielinski, F.U., Pape, T., Seifert, R., Moraru, C., Amann, R., Hourdez, S., Girguis, P.R., Wankel, S.D., Barbe, V., et al. (2011). Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. *Nature* 476, 176–180.
- Ponsard, J., Cambon-Bonavita, M.-A., Zbinden, M., Lepoint, G., Joassin, A., Corbari, L., Shillito, B., Durand, L., Cueff-Gauchard, V., and Compère, P. (2013). Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers to the hydrothermal vent host-shrimp *Rimicaris exoculata*. *ISME J.* 7, 96–109.
- Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Grønlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N., et al. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425, 585–592.
- Raulfs, E., Macko, S., and Van Dover, C.L. (2004). Tissue and symbiont condition of mussels (*Bathymodiolus thermophilus*) exposed to varying levels of hydrothermal activity. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 84, 229–234.
- Rauta, P.R., Samanta, M., Dash, H.R., Nayak, B., and Das, S. (2014). Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses. *Immunol. Lett.* 158, 14–24.
- Ren, Q., Qi, Y.-L., Hui, K.-M., Zhang, Z., Zhang, C.-Y., and Wang, W. (2012). Four invertebrate-type lysozyme genes from triangle-shell pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*). *Fish Shellfish Immunol.* 33, 909–915.
- Reynolds, S., and Rolff, J. (2008). Immune function keeps endosymbionts under control. *J. Biol.* 7, 28.

- Riesgo, A., Peterson, K., Richardson, C., Heist, T., Strehlow, B., McCauley, M., Cotman, C., Hill, M., and Hill, A. (2014). Transcriptomic analysis of differential host gene expression upon uptake of symbionts: a case study with *Symbiodinium* and the major bioeroding sponge *Cliona varians*. *BMC Genomics* 15, 376.
- Riou, V., Halary, S., Duperron, S., Bouillon, S., Elskens, M., Bettencourt, R., Santos, R.S., and Dehairs, F. (2008). Influence of CH<sub>4</sub> and H<sub>2</sub>S availability on symbiont distribution, carbon assimilation and transfer in the dual symbiotic vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeosciences* 5, 1681–1691.
- Roberts, S., Gueguen, Y., de Lorgeril, J., and Goetz, F. (2008). Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 1099–1104.
- Robinson, J.J., Polz, M.F., Fiala-medioni, A., and Cavanaugh, C.M. (1998). Physiological and immunological evidence for two distinct C<sub>1</sub>-utilizing pathways in *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), a dual endosymbiotic mussel from the Mid-Atlantic Ridge. *Mar. Biol.* 132, 625–633.
- Rocha, C., and Danchin, A. (2002). Base composition bias might result from competition for. *Trends Genet.* 18, 291–294.
- Rodriguez-Lanetty, M., Phillips, W.S., and Weis, V.M. (2006). Transcriptome analysis of a cnidarian-dinoflagellate mutualism reveals complex modulation of host gene expression. *BMC Genomics* 7, 23.
- Roeselers, G., and Newton, I.L.G. (2012). On the evolutionary ecology of symbioses between chemosynthetic bacteria and bivalves. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 1–10.
- Romero, a, Novoa, B., and Figueras, a (2015). The complexity of apoptotic cell death in mollusks: An update. *Fish Shellfish Immunol.* 46, 79–87.
- Romero, A., Estévez-Calvar, N., Dios, S., Figueras, A., and Novoa, B. (2011). New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis*. *PLoS One* 6, e17003.
- Ronald, P.C., and Beutler, B. (2010). Plant and Animal Sensors of Conserved Microbial Signatures. *Science* (80-. ). 330, 1061–1064.
- Rostovtseva, T.K., Tan, W., and Colombini, M. (2005). On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 129–142.
- Roth, M.S. (2014). The engine of the reef: photobiology of the coral-algal symbiosis. *Front. Microbiol.* 5, 422.
- Rouhbakhsh, D., Lai, C.-Y., von Dohlen, C.D., Clark, M. a., Baumann, L., Baumann, P., Moran, N. a., and Voegtlin, D.J. (1996). The tryptophan biosynthetic pathway of aphid endosymbionts (*Buchnera*): Genetics and evolution of plasmid-associated anthranilate synthase (*trpEG*) within the aphididae. *J. Mol. Evol.* 42, 414–421.
- Royet, J., Gupta, D., and Dziarski, R. (2011). Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 837–851.

- Ruby, E.G. (1996). Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* *50*, 591–624.
- Ruby, E.G., Urbanowski, M., Campbell, J., Dunn, a, Faini, M., Gunsalus, R., Lostroh, P., Lupp, C., McCann, J., Millikan, D., et al. (2005). Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: a symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 3004–3009.
- Russell, C.W., Bouvaine, S., Newell, P.D., and Douglas, A.E. (2013). Shared metabolic pathways in a coevolved insect-bacterial symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* *79*, 6117–6123.
- Sabourault, C., Ganot, P., Deleury, E., Allemand, D., and Furla, P. (2009). Comprehensive EST analysis of the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *BMC Genomics* *10*, 333.
- Sagan, L. (1967). On the Origin of Mitosing Clds. *J. Theor. Biol.* *14*, 225–274.
- Salerno, J.L., Macko, S.A., Hallam, S.J., Bright, M., Won, Y., Kiness, Z.O.E.M.C., and Dover, C.L.V.A.N. (2005). Characterization of Symbiont Populations in Life-History Stages of Mussels From Chemosynthetic Environments. 145–155.
- Salton, M.R.J. (1957). The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bacteriol Rev* *21*, 82–99.
- Salzet, M. (2001). Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. *Trends Immunol.* *22*, 285–288.
- Salzet, M., Tasiemski, A., Cooper, E., and Innate, E.C. (2007). Innate immunity in lophotrochozoans : the annelids . To cite this version : *12*, 3043–3050.
- Sayavedra, L., Kleiner, M., Ponnudurai, R., Wetzel, S., Pelletier, E., Barbe, V., Satoh, N., Shoguchi, E., Fink, D., Breusing, C., et al. (2015). Abundant toxin-related genes in the genomes of beneficial symbionts from deep-sea hydrothermal vent mussels. *Elife*.
- Schleicher, T.R., and Nyholm, S. V (2011). Characterizing the host and symbiont proteomes in the association between the Bobtail squid, *Euprymna scolopes*, and the bacterium, *Vibrio fischeri*. *PLoS One* *6*, e25649.
- Schwarz, J., Weis, V., and Potts, D. (2002). Feeding behavior and acquisition of zooxanthellae by planula larvae of the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Mar. Biol.* *140*, 471–478.
- Scott, K.M., Sievert, S.M., Abril, F.N., Ball, L. a, Barrett, C.J., Blake, R. a, Boller, A.J., Chain, P.S.G., Clark, J. a, Davis, C.R., et al. (2006). The genome of deep-sea vent chemolithoautotroph *Thiomicrospira crunogena* XCL-2. *PLoS Biol.* *4*, e383.
- Segonzac, M. De Saint Laurent, M. casanova, B. (1993). The enigma of the trophic behaviour of Alvinocaridid shrimps from hydrothermal vent sites on the Mid-Atlantic Ridge. *Cah. Biol. Mar.* *34*, 535–571.
- Selosse, M.-A. (2012). Symbiose & mutualisme versus évolution : de la guerre à la paix? Pour Une Biol. Évolutive.
- Shapiro, L., and Scherer, P.E. (1998). The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr. Biol.* *8*, 335–340.

- Shelton, C. a., and Wasserman, S. a. (1993). pelle encodes a protein kinase required to establish dorsoventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 72, 515–525.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., and Hattori, M. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS*. 81–86.
- Shugar, D. (1952). The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta* 8, 302–309.
- Skorpil, P., Saad, M.M., Boukli, N.M., Kobayashi, H., Ares-Orpel, F., Broughton, W.J., and Deakin, W.J. (2005). NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Mol. Microbiol.* 57, 1304–1317.
- Song, X., Zhang, H., Wang, L., Zhao, J., Mu, C., Song, L., Qiu, L., and Liu, X. (2011). A galectin with quadruple-domain from bay scallop *Argopecten irradians* is involved in innate immune response. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 592–602.
- Spang, A., Saw, J.H., Jørgensen, S.L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A.E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L., and Ettema, T.J.G. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521, 173–179.
- Spartz, A.K., Herman, R.K., and Shaw, J.E. (2004). SMU-2 and SMU-1. *Society* 24, 6811–6823.
- Stewart, F.J., and Cavanaugh, C.M. (2009). Pyrosequencing analysis of endosymbiont population structure: co-occurrence of divergent symbiont lineages in a single vesicomid host clam. *Environ. Microbiol.* 11, 2136–2147.
- Stewart, C.B., Schilling, J.W., and Wilson, a. C. (1987). Adaptive evolution in the stomach lysozymes of foregut fermenters. *Nature* 330, 401–404.
- Storey, K.B., and Storey, J.M. (2004). Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol. Rev.* 79, 207–233.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., et al. (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* 417, 959–962.
- Strand, M.R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Sci.* 15, 1–14.
- Stuart, L.M., and Ezekowitz, R.A.B. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* 22, 539–550.
- Sunila, I., and LaBanca, J. (2003). Apoptosis in the pathogenesis of infectious diseases of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Dis. Aquat. Organ.* 56, 163–170.
- Suzuki, Y., Kojima, S., Sasaki, T., Suzuki, M., Utsumi, T., Watanabe, H., Urakawa, H., Tsuchida, S., Nunoura, T., Hirayama, H., et al. (2006). Host-symbiont relationships in hydrothermal vent gastropods of the genus *Alviniconcha* from the Southwest Pacific. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1388–1393.
- Swaminathan, C., Brown, P., Roychowdhury, a, Wang, Q., Guan, R., Silverman, N., Goldman, W., Boons, G.-J., and Mariuzza, R. (2006). Dual strategies for peptidoglycan discrimination by peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 684–649.

- Tait, S.W., and Green, D.R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Cell Biol.* *11*, 621–632.
- Takai, K., Nakagawa, S., Reysenbach, A.-L., and Hoek, J. (2006). Microbial Ecology of Mid-Ocean Ridges and Back-Arc Basins. *Back Arc Spreading Syst. Geol. Biol. Chem. Phys. Interact.* 185–213.
- Takehana, A., Yano, T., Mita, S., Kotani, A., Oshima, Y., and Kurata, S. (2004). Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *EMBO J.* *23*, 4690–4700.
- Tanguy, A., Bierne, N., Saavedra, C., Pina, B., Bachère, E., Kube, M., Bazin, E., Bonhomme, F., Boudry, P., Boulo, V., et al. (2008). Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene* *408*, 27–36.
- Taylor, J.D., and Glover, E. a. (2006). Lucinidae (Bivalvia) - the most diverse group of chemosymbiotic molluscs. *Zool. J. Linn. Soc.* *148*, 421–438.
- Thao, M.L., and Baumann, P. (2004). Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 3401–3406.
- Thubaut, J., Puillandre, N., Faure, B., Cruaud, C., and Samadi, S. (2013). The contrasted evolutionary fates of deep-sea chemosynthetic mussels (Bivalvia, Bathymodiolinae). *Ecol. Evol.* *3*, 4748–4766.
- Toubiana, M., Gerdol, M., Rosani, U., Pallavicini, A., Venier, P., and Roch, P. (2013). Toll-like receptors and MyD88 adaptors in *Mytilus*: Complete cds and gene expression levels. *Dev. Comp. Immunol.* *40*, 158–166.
- Toubiana, M., Rosani, U., Giambelluca, S., Cammarata, M., Gerdol, M., Pallavicini, A., Venier, P., and Roch, P. (2014). Toll signal transduction pathway in bivalves: Complete cds of intermediate elements and related gene transcription levels in hemocytes of immune stimulated *Mytilus galloprovincialis*. *Dev. Comp. Immunol.* *45*, 300–312.
- Trench, R. k. (1979). The Cell Biology of plant-animal symbiosis. *Ann.rev. Plant Physiol.* *30*, 485–531.
- Troll, J. V, Adin, D.M., Wier, A.M., Paquette, N., Silverman, N., Goldman, W.E., Stadermann, F.J., Stabb, E. V, and McFall-Ngai, M.J. (2009). Peptidoglycan induces loss of a nuclear peptidoglycan recognition protein during host tissue development in a beneficial animal-bacterial symbiosis. *Cell. Microbiol.* *11*, 1114–1127.
- Troll, J. V, Bent, E.H., Pacquette, N., Wier, A.M., Goldman, W.E., Silverman, N., and McFall-Ngai, M.J. (2010). Taming the symbiont for coexistence: a host PGRP neutralizes a bacterial symbiont toxin. *Environ. Microbiol.* *12*, 2190–2203.
- Turens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* *552*, 335–344.
- Urcuyo, I. a., Massoth, G.J., Julian, D., and Fisher, C.R. (2003). Habitat, growth and physiological ecology of a basaltic community of *Ridgeia piscesae* from the Juan de Fuca Ridge. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* *50*, 763–780.
- V, I.S. (1998). REGULATION OF SYMBIOTIC. 33–57.

- Vaux, D.L., and Korsmeyer, S.J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245–254.
- Vavre, F. (2009). Éviter les tricheurs : mode de transmission et stabilité des symbioses. 33, 298–300.
- Venn, a a, Loram, J.E., and Douglas, a E. (2008). Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Bot.* 59, 1069–1080.
- Verma, S.C., and Miyashiro, T. (2013). Quorum sensing in the squid-Vibrio symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 16386–16401.
- Voolstra, C.R., Schwarz, J. a., Schnetzer, J., Sunagawa, S., Desalvo, M.K., Szmant, A.M., Coffroth, M.A., and Medina, M. (2009). The host transcriptome remains unaltered during the establishment of coral-algal symbioses. *Mol. Ecol.* 18, 1823–1833.
- Wang, J., and Aksoy, S. (2012). PGRP-LB is a maternally transmitted immune milk protein that influences symbiosis and parasitism in tsetse ' s offspring. *Pnas* 109, 10552–10557.
- Wang, Y., and Ruby, E.G. (2011). The roles of NO in microbial symbioses. *Cell. Microbiol.* 13, 518–526.
- Wang, D., Yang, S., Tang, F., and Zhu, H. (2012a). Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism. *Cell. Microbiol.* 14, 334–342.
- Wang, J., Hu, Y., Deng, W.W., and Sun, B. (2009). Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway. *Microbes Infect.* 11, 321–327.
- Wang, Q., Zhang, L., Zhao, J., You, L., and Wu, H. (2012b). Two goose-type lysozymes in *Mytilus galloprovincialis*: possible function diversification and adaptive evolution. *PLoS One* 7, e45148.
- Wang, Q., Wang, C., Mu, C., Wu, H., Zhang, L., and Zhao, J. (2013). A novel C-type lysozyme from *Mytilus galloprovincialis*: insight into innate immunity and molecular evolution of invertebrate C-type lysozymes. *PLoS One* 8, e67469.
- Wang, Z.M., Li, X., Cocklin, R.R., Wang, M., Wang, M., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Gupta, D., and Dziarski, R. (2003). Human peptidoglycan recognition protein-L is an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *J. Biol. Chem.* 278, 49044–49052.
- Watabe, H., and Hashimoto, J. (2002). A new species of the genus *Rimicaris* (Alvinocarididae: Caridea: Decapoda) from the active hydrothermal vent field, “Kairei Field,” on the Central Indian Ridge, the Indian Ocean. *Zoolog. Sci.* 19, 1167–1174.
- Wei, X., Yang, J., Yang, D., Xu, J., Liu, X., Yang, J., Fang, J., and Qiao, H. (2012). Molecular cloning and mRNA expression of two peptidoglycan recognition protein (PGRP) genes from mollusk *Solen grandis*. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 178–185.
- Weis, V.M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J. Exp. Biol.* 211, 3059–3066.
- Wendeberg, A., Zielinski, F.U., Borowski, C., and Dubilier, N. (2012). Expression patterns of mRNAs for methanotrophy and thiotrophy in symbionts of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus puteoserpentis*. *ISME J.* 6, 104–112.



- Wentrup, C., Wendeborg, A., Schimak, M., Borowski, C., and Dubilier, N. (2014). Forever competent: deep-sea bivalves are colonized by their chemosynthetic symbionts throughout their lifetime. *Environ. Microbiol.* *16*, 3699–3713.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 13772–13777.
- Widder, E. a (2010). Bioluminescence in the ocean: origins of biological, chemical, and ecological diversity. *Science* *328*, 704–708.
- Wilkinson, B., and Gilbert, H.F. (2004). Protein disulfide isomerase. *Biochim. Biophys. Acta* *1699*, 35–44.
- Won, Y.-J., Hallam, S.J., O'Mullan, G.D., Pan, I.L., Buck, K.R., and Vrijenhoek, R.C. (2003). Environmental Acquisition of Thiotrophic Endosymbionts by Deep-Sea Mussels of the Genus *Bathymodiolus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 6785–6792.
- Wu, D., Daugherty, S.C., Van Aken, S.E., Pai, G.H., Watkins, K.L., Khouri, H., Tallon, L.J., Zaborsky, J.M., Dunbar, H.E., Tran, P.L., et al. (2006). Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biol.* *4*, e188.
- Xue, Q., Hellberg, M.E., Schey, K.L., Itoh, N., Eytan, R.I., Cooper, R.K., and La Peyre, J.F. (2010). A new lysozyme from the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a possible evolutionary pathway for i-type lysozymes in bivalves from host defense to digestion. *BMC Evol. Biol.* *10*, 213.
- Xue, Q.-G., Schey, K.L., Volety, A.K., Chu, F.-L.E., and La Peyre, J.F. (2004). Purification and characterization of lysozyme from plasma of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* *139*, 11–25.
- Xue, Q.-G., Itoh, N., Schey, K.L., Li, Y.-L., Cooper, R.K., and La Peyre, J.F. (2007). A new lysozyme from the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) indicates adaptive evolution of i-type lysozymes. *Cell. Mol. Life Sci.* *64*, 82–95.
- Yang, B., Johnson, T.S., Thomas, G.L., Watson, P.F., Wagner, B., Furness, P.N., and El Nahas, a. M. (2002). A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* *62*, 1301–1313.
- Yang, J., Wang, L., Zhang, H., Qiu, L., Wang, H., and Song, L. (2011). C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and opsonization. *PLoS One* *6*, e17089.
- Yi, H.-Y., Chowdhury, M., Huang, Y.-D., and Yu, X.-Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *98*, 5807–5822.
- Yoshida, H., Kinoshita, K., and Ashida, M. (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* *271*, 13854–13860.
- Yue, X., Liu, B., and Xue, Q. (2011). An i-type lysozyme from the Asiatic hard clam *Meretrix meretrix* potentially functioning in host immunity. *Fish Shellfish Immunol.* *30*, 550–558.
- Zal, F., Leize, E., Oros, D.R., Hourdez, S., Dorsselaer, A. Van, and Childress, J.J. (2000). Haemoglobin structure and biochemical characteristics of the sulphide-binding component from the deep-sea clam *Calyptogena magnifica*. *Cah. Biol. Mar.* *41*, 413–423.

Zavalova, L.L., Baskova, I.P., Barsova, E. V., Snezhkov, E. V., Akopov, S.B., and Lopatin, S. a. (2004). Recombinant destabilase-lysozyme: Synthesis de novo in *E. coli* and action mechanism of the enzyme expressed in *Spodoptera frugiperda*. *Biochem.* 69, 776–781.

Zbinden, M., and Cambon-Bonavita, M.-A. (2003). Occurrence of Deferribacterales and Entomoplasmatales in the deep-sea Alvinocarid shrimp *Rimicaris exoculata* gut. *FEMS Microbiol. Ecol.* 46, 23–30.

Zhang, D., Jiang, S., Hu, Y., Cui, S., Guo, H., Wu, K., Li, Y., and Su, T. (2011). A multidomain galectin involved in innate immune response of pearl oyster *Pinctada fucata*. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1–6.

Zhao, J., Song, L., Li, C., Zou, H., Ni, D., Wang, W., and Xu, W. (2007). Molecular cloning of an invertebrate goose-type lysozyme gene from *Chlamys farreri*, and lytic activity of the recombinant protein. *Mol. Immunol.* 44, 1198–1208.

Zheng, L., Zhang, L., Lin, H., McIntosh, M.T., and Malacrida, a R. (2005). Toll-like receptors in invertebrate innate immunity. *Invertebr. Surviv. J.* 105–113.

Zhu, M.X., Ma, J., Parrington, J., Calcraft, P.J., Galione, A., and Evans, a M. (2010). Calcium signaling via two-pore channels: local or global, that is the question. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298, C430–C441.

Zielinski, F.U., Pernthaler, A., Duperron, S., Raggi, L., Giere, O., Borowski, C., and Dubilier, N. (2009). Widespread occurrence of an intranuclear bacterial parasite in vent and seep bathymodiolin mussels. *Environ. Microbiol.* 11, 1150–1167.

Zierenberg, R.A., Adams, M.W.W., and Arp, A.J. (2000). Life in extreme environments : Hydrothermal vents. *PNAS* 97, 12961–12962.

Zou, J., Chang, M., Nie, P., and Secombes, C.J. (2009). Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family. *BMC Evol. Biol.* 9, 85.

Zychlinsky, a, and Sansonetti, P. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Apoptosis in bacterial pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 100, 493–495.

## Table des illustrations

Figure 1.1 : Transmission verticale des symbiontes chez le charançon <i>Sitophilus oryzae</i> .....	p4
Figure 1.2 : Transmission horizontale par infection des racines de <i>Glycine max</i> .....	p5
Figure 1.3 : Congruence phylogénétique entre les punaises Acanthosomatidae et leur bactéries symbiotiques.....	p12
Figure 1.4 : Les voies Toll et Imd chez la drosophile.....	p16
Figure 1.5 : Les voies Toll et Imd chez les bivalves.....	p23
Figure 1.6 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose chez les bivalves (modèle <i>M.galloprovincialis</i> ).....	p27
Figure 1.7 : Schéma récapitulatif de la progression de la colonisation de l'organe lumineux par <i>V. fischeri</i> .....	p32
Figure 1.8 : Carte de la distribution mondiale des sources hydrothermales.....	p40
Figure 1.9 : Formation du fluide hydrothermale par entrée d'eau de mer froide dans les microfissures de la croûte.....	p41
Figure 1.10 : Exemple de fumeur noir actif au niveau de la dorsale medio-Atlantique, Rainbow (-2500m).....	p42
Figure 1.11 : Composition de la faune associée aux sources hydrothermales.....	p43
Figure 1.12 : Essaim de <i>Rimicaris exoculata</i> , sources hydrothermales de la dorsale médio-atlantique, site Rainbow (-2500m).....	p44
Figure 1.13 : Le ver géant <i>Riftia pachyptila</i> , sources hydrothermales de la ride est-Pacifique (-2508m) site Bio9.....	p45
Figure 1.14 : Le ver de pompeii <i>Alvinella pompejana</i> , sources hydrothermales de la ride est-Pacifique, (-2508m) site Bio9.....	p46
Figure 1.15 : <i>Calymene magnifica</i> sud-est de la ride Pacifique.....	p48
Figure 1.16 : Arbre phylogénétique des Bathymodiolinae.....	p51
Figure 1.17 : Carte des différents sites hydrothermaux connus de la dorsale médio-atlantique.....	p52
Figure 1.18 : Amas de <i>B. azoricus</i> au niveau du site Menez Gwen (-800m) de la dorsale médio-Atlantique.....	p53
Figure 1.19 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences d'ARNr 16S des endosymbiontes méthanotrophes et sulfoxydants associés aux bathymodiolinae du nord de la dorsale médio-atlantique.....	p55

Figure 1.20: A- Section transversale de filaments branchiaux de <i>Bathymodiolus azoricus</i> en FISH. B- Observation au microscope électronique à transmission de bactéries symbiotiques dans un bacteriocyte de filament branchiale de <i>B. azoricus</i> .....	p55
Figure 1.21: Schéma simplifié de la voie d'oxydation du méthane et du ribulose monophosphate (RuMP) chez les endosymbiontes MOX.....	p56
Figure 1.22: Schéma simplifié de la voie d'oxydation du sulfure d'hydrogène chez les endosymbiontes SOX.....	p57
Figure 3.1: Carte de la dorsale médio-atlantique et localisation du site d'échantillonnage.....	p90
Figure 3.2: Echantillonnage de la population naturelle et dépôt de cinq cages contenant une vingtaine de moules, loin du fluide, sur le basalte (T0).....	p91
Figure 3.3 : Design des expérimentations <i>in situ</i> aux temps T0, T1, T2 et T3.....	p92
Figure 3.4 : Quantification relative de la charge en bactéries SOX.....	p97
Figure 3.5 : Expression relative de l'activité ATP sulfurylase et HupL chez les symbiontes SOX.....	p98
Figure 3.6 : Gel d'électrophorèse à une dimension du protéome branchiale de <i>B.azoricus</i> .....	p100
Figure 3.7: Nombre de protéines identifiées dans la population naturelle en basalte T1 (BT1) basalte T2 (BT2) et basalte T3 (BT3).....	p102
Figure 3.8 : Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines identifiées du protéome de <i>B.azoricus</i> issus de la population naturelle (Lucky Strike, Montségur).....	p103
Figure 3.9 : Diagramme de Venn des protéines identifiées dans la condition population naturelle et BT1.....	p105
Figure 3.10 : Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines surexprimées dans la condition BT1 vis-à-vis de la population naturelle.....	p106
Figure 3.11 : Diagramme de Venn des protéines identifiées dans la condition population naturelle et BT2.....	p108
Figure 3.12 : Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines surexprimées dans la condition BT2 vis-à-vis de la population naturelle.....	p109
Figure 3.13 : Diagramme de Venn des protéines identifiées dans la condition population naturelle et BT3.....	p111
Figure 3.14 : Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines surexprimées dans la condition BT3 vis-à-vis de la population naturelle.....	p112
Figure 3.15 : Nombre de protéines identifiées en basalte T1 (BT1), TR1.2 et TR1.3.....	p118
Figure 3.16 : Diagramme de Venn des protéines identifiées dans la condition BT1 et TR1.2 (à gauche) et BT1 et TR1.3 (à droite).....	p119

Figure 3.17 : Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines surexprimées dans la condition TR1.2 vis-à-vis de la condition BT1.....	p119
Figure 3.18 : Importance des différents processus biologiques dans lesquels sont impliquées les protéines surexprimées dans la condition TR1.3 vis-à-vis de la condition BT1.....	p120
Figure 3.19 : Tendances des gènes dans les six clusters formés et nombres de gènes sur et sous-exprimés.....	p129
Figure 3.20 : Schéma simplifié des substrats et enzymes de la glycolyse.....	p136
Figure 3.21 : Schéma simplifié des substrats et enzymes du cycle de Krebs.....	p137
Figure 3.22 : Schéma simplifié des substrats et enzymes de la voie des pentoses phosphates.....	p137
Figure 3.23 : Schéma simplifié des protéines impliquées dans l'immunité chez <i>B.azoricus</i> .....	p141
Figure 3.24 : Schéma simplifié des protéines impliquées dans l'immunité chez <i>B.azoricus</i> .....	p143
Figure 3.25 : Schéma des protéines impliquées dans l'apoptose chez <i>B.azoricus</i> .....	p144
Figure 3.26 : Schéma des protéines impliquées dans l'apoptose chez <i>B.azoricus</i> .....	p145
Figure 5.1 : Schéma récapitulatif des conséquences de la mise sur le basalte et de la perte de symbiote sur le métabolisme et l'immunité de l'hôte.....	p236
Figure 5.2 : Schéma récapitulatif des conséquences du retour sur site et du maintien de la charge symbiotique sur le métabolisme et l'immunité de l'hôte.....	p237
Figure 5.3 : Schéma simplifié des hypothèses formulées quant à la régulation de la symbiose dans un bacteriocyte.....	p239
Figure 5.4 : Schéma simplifié de l'action du lysozyme 3 dans la diminution de la charge symbiotique.....	p242

# Table des tableaux

Tableau 1.1 : Interactions biotiques et effets sur les partenaires.....	p2
Tableau 1.2 : Peptides antimicrobiens chez <i>Drosophila melanogaster</i> .....	p17
Tableau 1.3 : Tableau récapitulatif des différents peptides antimicrobiens chez les bivalves.....	p25
Tableau 1.4 : Concentration en composés réduits, métaux et métaux lourds des fluides hydrothermaux des sites Menez Gwen, Lucky Strike et Rainbow de la dorsale Médio-Atlantique.....	p52
Tableau 3.1 : Tableau des amorces utilisées pour mesurer la charge symbiotique.....	p94
Tableau 3.2: Séquence des primers.....	p95
Tableau 3.3: Protéines impliquées dans le métabolisme général de <i>B.azoricus</i> qui sont sur ou sous-exprimées en condition BT1 comparé à la population naturelle.....	p107
Tableau 3.4: Protéines impliquées dans le métabolisme général de <i>B.azoricus</i> sur ou sous-exprimées en condition BT2 comparé à la population naturelle.....	p110
Tableau 3.5: Protéines impliquées dans le métabolisme général de <i>B.azoricus</i> étant sur ou sous-exprimées en condition BT3 comparé à la population naturelle.....	p113
Tableau 3.6: Protéines impliquées dans la réponse immunitaire.....	p114
Tableau 3.7: Protéines impliquées dans les mécanismes d'apoptose étant sur ou sous-exprimées en condition BT1 (violet), BT2 (rouge) et BT3 (orange) comparé à la population naturelle.....	p117
Tableau 3.8: Protéines impliquées dans le métabolisme général de <i>B.azoricus</i> étant sur ou sous-exprimées en condition TR1.2 comparé à la condition BT1.....	p121
Tableau 3.9: Protéines impliquées dans le métabolisme général de <i>B.azoricus</i> étant sur ou sous-exprimées en condition TR1.3 comparé à la condition BT1.....	p122
Tableau 3.10: Protéines impliquées dans la réponse immunitaire.....	p124
Tableau 3.11: Protéines impliquées dans les mécanismes de catabolisme et d'apoptose étant sur ou sous-exprimées en condition TR1.2 (en haut), TR1.3(en bas) comparé à la condition BT1.....	p124
Tableau 3.12: Protéines pro ou anti-apoptotiques différenciellement exprimées entre les trois comparaisons.....	p131
Tableau 3.13 : Protéines impliquées dans les processus immunitaires chez <i>B. azoricus</i> .....	p132